

新規組換え七面鳥ヘルペスウイルスの構築と

鶏用ワクチンへの応用に関する研究

江崎 素之

目 次

諸言	1
第1章 伝染性喉頭気管炎に対する組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクターの 構築と評価	6
第1節 序論	6
第2節 実験材料及び実験方法	9
第3節 結果及び考察	17
第4節 まとめ	20
第2章 ニューカッスル病に対する組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクターの 構築と評価	34
第1節 序論	34
第2節 実験材料及び実験方法	36
第3節 結果及び考察	40
第4節 まとめ	44

第3章 トリインフルエンザに対する組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクター の構築と評価.....	58
第1節 序論	58
第2節 実験材料及び実験方法	60
第3節 結果及び考察	64
第4節 まとめ	68
第4章 総括	82
参考文献	84
学術雑誌掲載論文目録	94
謝辞	95

本研究で用いた略号一覧表

AIV	Avian influenza virus	トリインフルエンザウイルス
AP	Alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
Bac	Beta-actin	ベータアクチン
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate	
bp	Base pairs	塩基対
CEF	Chicken embryo fibroblasts	鶏胚線維芽細胞
CMV	Cytomegalovirus	サイトメガロウイルス
DIG	Digoxigenin	ジゴキシゲニン
DIVA	Differentiating infected from vaccinated animals	
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
EID50	50% embryo infectious dose	50%発育鶏卵感染価
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
F	Fusion	
FITC	Fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアネート
gB	Glycoprotein B	
HA	Hemagglutinin	
HI	Hemagglutination inhibition	赤血球凝集抑制
HN	Hemagglutinin-neuraminidase	
HVT	Turkey herpesvirus	七面鳥ヘルペスウイルス
HVT/AI	組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクタートリインフルエンザワクチン	
HVT/LT	組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクター伝染性喉頭気管炎ワクチン	
HVT/ND	組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクターニューカッスル病ワクチン	
IBDV	Infectious bursal disease virus	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス
IFA	Immunofluorescence assay	免疫蛍光抗体法
ILTV	Infectious laryngotracheitis virus	伝染性喉頭気管炎ウイルス
MDV	Marek's disease virus	マレック病ウイルス
NA	Neuraminidase	
NBT	Nitro-blue tetrazolium	
NDV	Newcastle disease virus	ニューカッスル病ウイルス
OIE	Office international des épizooties	国際獣疫事務局
pfu	Plaque forming units	
PVDF	Polyvinylidene difluoride	ポリフッ化ビニリデン
rHVT	Recombinant turkey herpesvirus	組換え七面鳥ヘルペスウイルス
RSV	Rous sarcoma virus	ラウス肉腫ウイルス
SPF	Specific pathogen free	特定病原体不在
SV40	Simian virus 40	サルウイルス 40

緒言

近年、養鶏産業においては、採卵鶏、肉用鶏ともに生産の大規模集約化が進んでいる。それに加え、生産手法の近代化や効率化に伴い、単位面積当りの飼育密度が上昇している。こうした生産の大規模集約化、効率化に起因する感染症の発生リスク、その拡大リスクの増大が大きな問題となっている。その対策としては、消毒の徹底、人・車輛の移動制限、防鳥ネットの設置などの農場外部からの病原体侵入防止を目的としたバイオセキュリティの強化と、疾病の発症防止及び症状軽減を企図したワクチン接種の効果的な併用が重要と考えられている。

鶏の代表的な疾病には、伝染性喉頭気管炎、ニューカッスル病、トリインフルエンザ、マレック病、伝染性ファブリキウス嚢病、鶏マイコプラズマ症、家禽サルモネラ感染症、鶏コクシジウム症などが挙げられる。このうち、トリインフルエンザ、家禽サルモネラ感染症などは人獣共通感染症であり、公衆衛生の観点からも鶏の疾病制御は極めて重要である。これらの多様な疾病に対処するため、養鶏場においては、ワクチンの頻回接種を余儀なくされているのが現状である。性状や投与経路、投与時期の異なる様々なワクチンが用いられ、また、一つの疾病に対して複数回の接種が行われる場合も多くみられる。こうした頻回接種により、鶏に対するストレスの増大が懸念されるとともに、ワクチン接種に伴う生産者の負担も増加している。

従来型ワクチンには、大きく分けて、病原性の低い弱毒化株を利用した生ワクチンと、ホルマリンやバイナリーエチレンイミンなどにより不活化した病原体を用いた不活化ワクチンがある。生ワクチンは、通常、接種された動物の体内で増殖するため、液性免疫に加えて細胞性免疫を誘導でき、一般的に免疫付与能が高いという利点がある。しかしながら、生ワクチンに用いられる弱毒株

には、病原性が残留しているものも多くみられ、特に他の病原体が共存している場合、または他の生ワクチンと併用した場合に臨床症状を引き起こすケースもある。また、弱毒株の中には、動物間で伝播を繰り返すうちに病原性復帰するものもみられる。一方、不活化ワクチンには残留病原性、病原性復帰の恐れはないが、液性免疫のみしか誘導できないため、効果の面では生ワクチンに劣ることが多い。また、不活化ワクチンに用いるアジュバント（免疫賦活剤）に由来する副反応が発生するケースもみられる。さらに、鶏などの家畜においては、親から受け継がれる移行抗体が接種したワクチンに作用し、その効果発揮を妨げることが知られている。このように、現行ワクチンには、効果の面からも、安全性の面からも、改良の余地が多い。そのため、より効果的で安全性が高い新規ワクチンの開発が望まれている。

近年、分子生物学の手法を用い、病原体の防御抗原遺伝子を組み込んだ動物用あるいはヒト用組換えベクターワクチンの研究開発が進められている。組換えベクターワクチンは、接種された動物またはヒトの体内で病原体の防御抗原を産生し、それに対する免疫を誘導することができる。適切なベクターを選択することにより、ワクチンの安全性向上や多価化、免疫効果の向上及び長期持続といったメリットが期待される。これまでに、ベクターとして、アデノウイルス (Ballay *et al.*, 1985; Graham, 1990)、ポックスウイルス (Panicali *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1983)、ヘルペスウイルス (Lowe *et al.*, 1987; Shih *et al.*, 1984) などの DNA ウイルス、レトロウイルス (Hunt *et al.*, 1988)、ラブドウイルス (Roberts *et al.*, 1998)、パラミクソウイルス (Walsh *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) などの RNA ウイルスが検討されている。

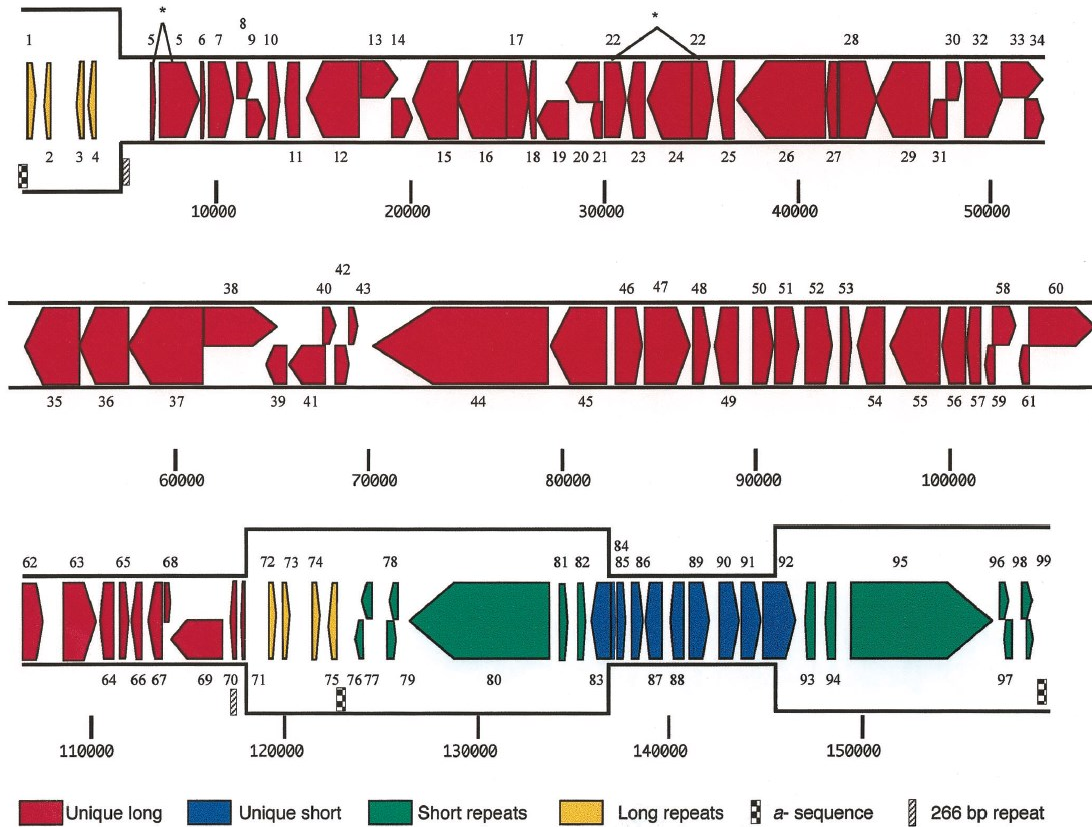
鶏用ベクターとしては、ポックスウイルスである鶏痘ウイルス (Ogawa *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1988)、パラミクソウイルスであるニューカッスル病ウイルス (NDV) (Nakaya *et al.*, 2001; Swayne *et al.*, 2003)、ヘルペスウイルスであるマレック病ウイルス (MDV) や七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) (Morgan *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1993; Sakaguchi *et al.*, 1998) などが検討されてきている。ポックスウ

ウイルスは比較的組換えウイルスの作出が容易であることから、研究開発が早期に進められ、1994年に、米国において鶏用の組換え鶏痘ウイルスベクターニューカッスル病ワクチンが製造承認を受けている。組換え鶏痘ウイルスベクターワクチンは、皮膚に接種後、一過性に増殖して10日ほどで消失するため、免疫の誘導時期は早いものの、誘導能はそれほど高くなく、また、効果持続期間も長くない。さらに移行抗体の影響を受けやすいという欠点もある。一方、組換えヘルペスウイルスベクターは、接種直後に増殖し、抗原に対する免疫を誘導した後、潜伏感染して体内に留まるため、免疫の長期持続が期待できる。また、特にMDVやHVTの場合は感染が直接接触した細胞間で進むという特徴があるため(Schat & Nair, 2013)、血中に存在する移行抗体の影響を受けにくいことが予想される。これらの理由から、MDVやHVTは次世代の鶏用ベクターとしての応用が期待されている。

HVTは、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科、マルディウイルス属に分類される。HVTはMDVと抗原的に類似していることから、MDV血清型3型とも呼ばれる。元来健康な七面鳥から分離されたウイルス(Kawamura *et al.*, 1969; Witter *et al.*, 1970)で、本質的に非病原性であり、マレック病に対する有効かつ安全な生ワクチンとして、40年にわたり使用されている(Schat & Nair, 2013)。HVTの接種は初日齢雛に対する頸部皮下接種、もしくは18-19日齢鶏胚に対する卵内(*in ovo*)接種にて行われ、接種後は主にリンパ球に感染して増殖した後、潜伏感染する。HVTの宿主域は鳥類に限られることから、自然界への影響も最小限にとどめられる。また、HVTのゲノムサイズは約159 kbと比較的大きく(Fig. 1)(Afonso *et al.*, 2001)、遺伝子挿入が可能と思われる非必須領域が多く存在することから、外来の防御抗原遺伝子を挿入する鶏用ベクターとしての利用が期待できる。

現在では、多くの研究者がHVTの鶏用ベクターとしての有用性に注目し、研究を進めている。これまでに、NDV、MDV、または伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)の防御抗原遺伝子を挿入した組換えHVTベクターを作製し、

評価した例が報告されている (Darteil *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1993; Sakaguchi *et al.*, 1998; Tsukamoto *et al.*, 2003)。しかしながら、組換え HVT ベクターワクチンによる防御免疫の持続期間、免疫開始時期などを多面的に検討した例はない。さらに、鶏の多岐に渡る病原体のうち、これまでに検討されたものは NDV、MDV または IBDV の 3 種類にすぎない。従って、本研究ではニューカッスル病に加えて、伝染性喉頭気管炎、トリインフルエンザといった、近年特に問題となっている疾病に着目し、これらの病原体の防御抗原遺伝子をそれぞれ挿入した 3 種類の組換え HVT (rHVT) を構築した。その後、作製した rHVT による防御抗原発現、遺伝的安定性、安全性、及び免疫付与能を多面的に解析することにより、HVT の鶏用ベクターとしての有用性を明らかにすることを目的とした。まず、第 1 章では、HVT に伝染性喉頭気管炎ウイルス (ILTV) の防御抗原遺伝子を挿入した rHVT を構築し、防御抗原蛋白質発現、細胞内増殖能、伝染性喉頭気管炎に対する効果などの解析を行った。第 2 章では、NDV の防御抗原遺伝子を挿入した rHVT を構築し、そのニューカッスル病に対する免疫付与効果、特に免疫開始時期と免疫持続期間に関する検討を行った。第 3 章では、トリインフルエンザウイルス (AIV) の防御抗原遺伝子を挿入した rHVT を構築し、まず AIV の防御抗原遺伝子発現に適したプロモーターの検討を行った後、rHVT のトリインフルエンザに対する防御効果を解析した。



(Afonso *et al.*, 2001)

Fig. 1. Linear map of the HVT genome. Genes (colored arrows) are numbered from left to right based on positions of methionine initiation codons and transcribed in the direction indicated. Genes included in different genomic regions are defined by the color key. Nucleotide positions are indicated below the map. Spliced genes are indicated by asterisks.

第1章 伝染性喉頭気管炎に対する組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクターの構築と評価

第1節 序論

組換えベクターワクチンの開発において重要な点として、適切なベクターの選択の他に、ベクターの中の遺伝子挿入部位の選択、防御抗原遺伝子の発現を制御するプロモーターの選択、適切な対象病原体の防御抗原遺伝子の選択が挙げられる。

ベクターゲノム内における遺伝子挿入部位は、ベクターの増殖に非必須な領域でなければならない。それには、ベクターの非必須遺伝子中に外来遺伝子を挿入する方法と、遺伝子間の非翻訳領域に外来遺伝子を挿入する方法とが考えられる。HVTで前者の方法を用いた例としては、非必須遺伝子と考えられる *TK* 遺伝子中 (Ross *et al.*, 1993)、*US2* 遺伝子中 (Morgan *et al.*, 1992)、*US10* 遺伝子中 (Cronenberg *et al.*, 1999)、*UL40* 遺伝子中、または *glycoprotein I* 遺伝子中 (Darteil *et al.*, 1995) などへの外来遺伝子の挿入が報告されている。後者の方法を用いた例としては、*UL55* 遺伝子と *HVT ORF3* 遺伝子間、及び *HVT ORF3* 遺伝子と *LORF4A* 遺伝子間の領域での検討が報告されている (Bublott *et al.*, 1999)。本研究では、我々のグループが以前に同定した、*UL45* 遺伝子と *UL46* 遺伝子間の非翻訳領域を遺伝子挿入部位として使用した (公開特許公報：特開平 11-192023)。

プロモーターは、遺伝子の上流側に位置し、その遺伝子の転写制御を行う領域である。防御抗原遺伝子の制御に用いるプロモーターの種類により、産生される防御抗原蛋白質の量が増減するため、組換えベクターワクチンの開発においてはプロモーターの選択も重要な要素である。脊椎動物細胞での外来蛋白質の発現制御によく用いられるプロモーターとしては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サルウイ

ルス 40 (SV40) プロモーターなどが挙げられる。中でも、CMV プロモーターや RSV プロモーターは rHVT での使用が報告されている (Darteil *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1992)。本章では、我々のグループが以前開発した融合プロモーター (Pec プロモーター) を選択した (Tsukamoto *et al.*, 2002)。Pec プロモーターは、IBDV の抗原遺伝子である VP2 遺伝子の発現制御において実績のある、CMV プロモーターのエンハンサー領域と鶏ベータアクチン (Bac) プロモーターの一部の融合プロモーターである。

伝染性喉頭気管炎は、呼吸困難、結膜炎、鼻汁漏出、血痰の排出等の臨床症状を特徴とする鶏の急性呼吸器疾患である。世界中に分布しており、本疾患に感染した鶏は、産卵率が低下し、死亡率が増加する。その結果、生産性が低下するため、養鶏業に多大な経済的損失を与えている (Garcia *et al.*, 2013)。以前は採卵鶏にて良く認められた疾病であったが、近年では肉用ブロイラー鶏での流行の例が多くみられ、問題となっている (Crespo *et al.*, 2007; Dufour-Zavala, 2008; Sellers *et al.*, 2004)。これまで、伝染性喉頭気管炎に対するワクチンとしては、鶏胚馴化または細胞馴化により弱毒化された生ワクチンが広く用いられてきた。これらの弱毒生ワクチンは防御効果は優れているものの、ワクチン接種鶏から非接種鶏に容易に伝播すること (Andreasen *et al.*, 1989; Hilbink *et al.*, 1987; Rodriguez-Avila *et al.*, 2007)、また、鶏の間で継代されることにより病原復帰することが示されている (Guy *et al.*, 1991)。実際に、近年の流行で分離された野外ウイルスの大部分は、鶏胚馴化ワクチン株に由来していると考えられている (Dufour-Zavala, 2008; Guy *et al.*, 1989; Guy *et al.*, 1990; Oldoni *et al.*, 2007)。さらに、野外に放出された弱毒ワクチン株が、他の弱毒株と組換えを起こして強毒株となったと考えられる例も報告されている (Lee *et al.*, 2012)。従って、より安全な、生ウイルスを放出しない新たな伝染性喉頭気管炎ワクチンの開発が急務である。

伝染性喉頭気管炎の病原因子である ILTV は gallid herpesvirus 1 とも呼ばれ、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科、イルトウイルス属に属

する。防御抗原としては、ILTV のウイルス表面に存在する各種の糖蛋白質が重要とされており、液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導することが示されている (York & Fahey, 1990)。このうち、glycoprotein B (gB) 蛋白質は、ヘルペスウイルス科の中で良く保存されており、ウイルスの細胞表面への接着や細胞内への侵入に関与している (Pereira, 1994; Spear, 1993)。また、ヘルペスウイルスの gB 蛋白質は中和抗体 (Cranage *et al.*, 1986; Marlin *et al.*, 1986) 及び細胞性免疫 (Sabbaj *et al.*, 2011; Zarling *et al.*, 1986) を誘導できることが示されており、組換えベクターワクチンで発現する防御抗原としての応用が期待できる (Cranaga *et al.*, 1986; Sabbaj *et al.*, 2011)。ILTV の gB 蛋白質も、他のヘルペスウイルスの gB 蛋白質に共通する特徴を持っており (Griffin, 1991)、これまでに、ILTV gB 蛋白質をコードする遺伝子を含む組換え鶏痘ウイルスベクター及び DNA ワクチンが作製され、鶏において伝染性喉頭気管炎に対する防御効果を発揮することが明らかになっている (Chen *et al.*, 2011; Davison *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2001)。しかしながら、これまでに HVT ベクターに ILTV gB 遺伝子を挿入した例は報告されていない。

そこで本章では、ILTV gB 蛋白質のうち、細胞外に露出し防御抗原エピトープを保持していると考えられる前半部分をコードする遺伝子を用い、これを HVT に挿入して rHVT を作製した (以下 HVT/LT と略記する)。また、HVT/LT の細胞内増殖能、及び gB 抗原蛋白質発現を解析し、さらに、ILTV 強毒株の攻撃に対する防御効果を調べた。

第 2 節 実験材料及び実験方法

2-1 実験に用いたウイルス及び細胞

HVT FC-126 株 (Witter *et al.*, 1970) はアメリカ農務省 Avian Disease and Oncology Laboratory の R. L. Witter 博士から入手し、10-11 日齢特定病原体不在 (SPF) 鶏胚から作製した鶏胚線維芽細胞 (CEF) にて増殖させた。細胞の培養は、Leibovitz's L-15 (Sigma-Aldrich 社) 及び McCoy's 5A 培地 (Sigma-Aldrich 社) (1:1 混合)、及び 4% 仔ウシ血清から成る培地 (LM (+) 培地) を用いて行った。MDV の強毒 RB1B 株 (Schat *et al.*, 1982) は、コーネル大学の K. A. Schat 博士から入手し、SPF 鶏にて増殖させた。ILTV の強毒 USDA 株は、アメリカ農務省 National Veterinary Services Laboratories より入手し、9-11 日齢 SPF 鶏胚の漿尿膜にて増殖させた。

2-2 組換えプラスミドの作製

本研究におけるプラスミド構築は、特に記載がない限り、Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition. (Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y. 2012) 記載の標準的な分子生物学手法を用いて行った。また本節で使用したプライマーの配列は、Table 1-1 に記載した。

まず、HVT FC-126 株より抽出した DNA をテンプレートとし、PCR により本研究に用いる挿入部位である *UL45* 遺伝子と *UL46* 遺伝子間の非翻訳部位の近傍領域を取得するとともに、挿入部位の位置に制限酵素 *SfiI* 認識配列を挿入した。具体的には、P1 プライマーと P2 プライマー、及び P3 プライマーと P4 プライマーにて PCR を行い、次にこれら 2 つの PCR 産物を混合したものをテンプレートとして、P1 と P4 プライマーにて PCR を行うことにより目的断片を得た。この断片を *EcoRI* と *HindIII* で切断したものを pUC18 (タカラバイオ社) に挿入し、p45/46Sfi を構築した。なお、PCR は、Pfu DNA Polymerases (Agilent Technologies 社) を用いて行った。

ILTV *gB* 遺伝子は、米国野外株 632 株 (Poulsen *et al.*, 1991) より取得し、その前半部分を使用した。ウイルス DNA をテンプレートとし、L1 プライマー及び L2 プライマーを用いた PCR により、*gB* 遺伝子全長 (2619 bp (base pairs)) のうち、前半 1288 bp 断片を取得した。この断片を、CMV プロモーターのエンハンサー領域と Bac プロモーターの一部の融合プロモーターである Pec プロモーターを持つプラスミド、pGI_{Pec} に挿入し、pGI_{Pec}ILgB_{del} とした。さらに、SV40 ポリ A シグナル配列を pBK-CMV (Agilent Technologies 社) より PCR にて取得し、pGI_{Pec}ILgB_{del} に挿入して pGI_{Pec}ILgB_{del}2 とした。本組換えプラスミドには、マーカー遺伝子として β -ガラクトシダーゼをコードする大腸菌由来 *lacZ* 遺伝子を加えた。pNZ1729R (Yanagida *et al.*, 1992) より取得した *lacZ* 遺伝子を、pBK-RSV (Agilent Technologies 社) から得た RSV プロモーター、及び MDV *UL46* 遺伝子由来のポリ A シグナル配列 (Yanagida *et al.*, 1993) とともに p45/46Sfi に挿入し、p45/46RSVlac-T とした。最後に、pGI_{Pec}ILgB_{del} の *Bgl*I 断片を p45/46RSVlac-T の *Sfi*I 部位に挿入し、HVT/LT 構築用組換えプラスミド p45/46PecILgB_{del}lac を作製した (Fig. 1-1)。

2-3 組換えウイルスの構築

まず、Morgan らの方法により、HVT FC-126 株の DNA を調製した (Morgan *et al.*, 1990)。 1×10^7 個の CEF を saline G 溶液 (140 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM 塩化カリウム、1.1 mM リン酸一水素二ナトリウム、1.5 mM リン酸二水素一ナトリウム、0.5 mM 塩化マグネシウム・6 水和物、0.011% グルコース) に懸濁し、HVT DNA と 10 μ g の組換えプラスミドを加えた。この混合液を 0.4-cm キュベット (Bio-Rad Laboratories 社) に移し、0.5 kV、25 μ F の条件下で、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションにはジーンパルサーII (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いた。細胞を室温で 10 分間静置した後、96 穴培養プレートに移した。プラークが出るまで、37°C、4-5% CO₂ インキュベーター中で 7 日程度培養した後、プレートの各ウェルの細胞をトリプシン処理し、新たな CEF

を追加して 96 穴培養プレート 2 枚の各ウェルに移した。こうして作製したレプリカプレートを、プラークが出現するまで 3-4 日程度培養した。スクリーニングは、マーカー遺伝子である *lacZ* 遺伝子が発現する β -ガラクトシダーゼの活性を利用した、カラーセクション法にて行った。 β -ガラクトシダーゼを発現しているプラークの染色には、 β -Gal Staining Kit (Life Technologies 社) を用いた。まず、2 枚のプレートのうち 1 枚の培地を捨て、キットに含まれる固定液を加えて室温で 10 分間インキュベートした。Phosphate buffered saline (PBS ; 137 mM 塩化ナトリウム、8.1 mM リン酸一水素ナトリウム、2.7 mM 塩化カリウム、1.47 mM リン酸二水素カリウム) で洗浄した後、染色液を加え、37°C で 30 分から 2 時間インキュベートした。

染色された rHVT のプラークを含むウェルに相当するレプリカプレートのウェルから細胞をトリプシン処理により回収、希釈し、新たな CEF と混合して 96 穴プレートに分注することにより、一回目の純化を完了した。この純化過程を、全てのプラークがカラーセクション法で染色することが確認できるまで繰り返した。得られたクローンから抽出した DNA を用いて、HVT 挿入部位を挟んだ領域を増幅するプライマーセット、45/46-F プライマーと 45/46-R プライマーにより PCR を行い、HVT FC-126 親株 (非組換え体) の存在の有無を検討した。

2-4 サザンブロット法

構築した HVT/LT のゲノム構造の解析は、サザンブロット法にて行った。まず、HVT/LT もしくは HVT FC-126 株を 100-mm 径培養皿中の CEF に感染させた。感染細胞をスクレーパーで培養皿から剥がした後、遠心分離 (913 x g、5 分間) して回収した。PBS で洗浄後 1.0 mL の lysis buffer (0.5% Triton X-100、100 mM 2-メルカプトエタノール、20 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を PBS に加えたもの) に再懸濁し、30 秒間ボルテックスした後、15 分間室温で静置した。2,060 x g で 5 分間遠心して細胞核、残渣を除去し、上澄みを 1.5 mL チューブに移した後、4°C、20,800 x g で、20 分間遠心してウイルスを回収した。沈殿を

nuclease solution (12.5 mM Tris-Cl (pH7.5)、1 µg/mL DNaseI、1 µg/mL RNaseA) を 0.33 ml で再懸濁して、37°Cで 30 分間インキュベートした。その後、SDS-protease solution (50 mM EDTA、5% SDS、0.5 mg/mL Protease K、25 mM 2-メルカプトエタノール) を 83 µL 加えて、55°Cで 30 分間静置し、ウイルスのエンベロープを破壊した。フェノール/クロロホルム混合液で 2 回抽出した後、-20°Cで冷やしたエタノールを水層の 2.5 倍量になるように加え、さらに塩化ナトリウムを最終濃度が 160 mM になるように加えて DNA を沈殿させた。20,800 x g で 30 分間遠心分離して沈殿させた DNA を 70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、TE 緩衝液 (10 mM Tris-Cl (pH8.0)、1 mM EDTA) に溶かした。

こうして回収されたウイルス DNA と組換えプラスミド (陽性対照) を制限酵素、*Pst*I と *Xho*I で切断し、アガロースゲル電気泳動を行った。分離された DNA 断片を **Biodyne**[®] A ナイロンメンブレン (PALL 社) にブロットした後、digoxigenin (DIG) で標識された gB プローブもしくは HVT 挿入部位プローブにてハイブリダイゼーションを行った。これらのプローブは PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science 社) の試薬を用い、作製した。gB プローブと HVT 挿入部位プローブ作製に用いたプライマーセットは、それぞれ gB-F プライマーと gB-R プライマー、及び 45/46-F プライマーと 45/46-R プライマーである。

メンブレンを室温の 2 x SSC 溶液 (150 mM 塩化ナトリウム、17 mM クエン酸ナトリウム、pH7.0) で洗浄した後、次に 68°Cに加熱した 0.5 x SSC 溶液で洗浄した。次に、anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche Applied Science 社) を加えて室温で 30 分間インキュベートし、マレイン酸洗浄液 (0.1 M マレイン酸、0.15 M 塩化ナトリウム、0.3% Tween20、pH7.5) で 2 回洗浄した後、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate /nitro-blue tetrazolium 溶液 (BCIP/NBT ; Bio-Rad Laboratories 社) を加えることにより、プローブと結合した DNA のバンドを可視化した。

2-5 ILTV gB 蛋白質に対する抗体の作製

大腸菌で発現させた TrpE 融合 ILTV gB 蛋白質を精製し、不完全フロイントアジュバント (Sigma-Aldrich 社) と混合してヤギに皮下、または筋肉内注射した。gB 蛋白質の接種を 7 回繰り返した後、採血して血清を分離し、抗 ILTV gB 抗体とした。

2-6 ウェスタンブロット法

HVT/LT もしくは HVT 親株を、100-mm 径培養皿中の CEF に multiplicity of infection (MOI) 約 0.01 で感染させ、2、3 日後に感染細胞をスクレーパーで培養皿から剥がした後、913 x g で 5 分間遠心分離して回収した。細胞ペレットを PBS で 2 回洗浄後、100 μ L の PBS で再懸濁した。同量の 2 x SDS サンプルバッファー (130 mM Tris-Cl (pH6.8)、6% SDS、20% Glycerol、10% 2-メルカプトエタノール、0.01% ブロモフェノールブルー) を加えた後、100°Cにて 5 分間加熱した。得られたサンプルを、8%ポリアクリルアミドゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン (イモビロン-P メンブレン ; Millipore 社) に転写した。このメンブレンを、まず、ヤギ抗 ILTV gB 抗血清を用いてインキュベートした。PBS にて洗浄後、2 次抗体として、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗ヤギ IgG-Fc 抗体 (Bethyl 社) を用いてインキュベートした。最後に、gB 蛋白質に対する抗体が結合した蛋白質を、BCIP/NBT 溶液を加えることにより染色した。

2-7 免疫蛍光抗体法 (IFA)

HVT/LT、または HVT 親株を感染させた培養皿中の CEF を、感染 4-5 日後にアセトン : メタノール混合液 (1:2) で固定し、ヤギ抗 ILTV gB 抗血清を用いてインキュベートした。PBS にて洗浄後、2 次抗体として、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いてインキュベートした。蛍光の観察は、蛍光顕微鏡下にて行った。

2-8 HVT/LT の細胞内における増殖曲線

100-mm 径培養皿中の CEF に、2,000 plaque forming units (pfu) の HVT/LT、または HVT 親株を感染させ、37°C、4-5% CO₂ インキュベーター中で培養した。16、24、40、44、48、52、64、69、72 及び 88 時間後にトリプシン処理して感染細胞を回収し、適宜希釈してウイルス力価を測定した。

2-9 HVT/LT の細胞内での安定性

HVT/LT を 6 穴培養プレート内ウェル中の CEF に感染させ、3-4 日間培養した後、感染細胞をトリプシン処理にて回収し、一部を新たなウェル中の CEF に感染させた。これを 20 回繰り返した後に回収した HVT/LT を用い、サザンブロット法、及びウェスタンブロット法にて解析した。

2-10 HVT/LT の鶏体内での安定性

初日齢の SPF 鶏 (Charles River Laboratories 社) 10 羽の頸部皮下に、HVT/LT を 30,000 pfu で接種し、一週間後に、注射器容量の 1/10 量のヘパリン溶液 (100 U/mL、Sigma-Aldrich 社) を含む注射器を用いて採血を行った。取得した血液を、新たな初日齢 SPF 鶏 10 羽の頸部皮下に 0.5-1 mL/羽にて接種した。上記の操作を 5 回繰り返した。5 回目の継代時には、初日齢 SPF 鶏 25 羽に接種し、うち 10 羽は 7 日齢にて採血を行い、ウイルス分離を試みた。残りの 25 羽については、45 日齢まで飼育し、マレック病または伝染性喉頭気管炎に特徴的な、沈鬱、食欲減退、呼吸器症状などの臨床症状を観察後、解剖を行い、各臓器の肉眼病変を観察した。

一方、7 日齢にて取得した血液からのウイルス分離は以下のように行った。ヘパリン溶液を含む注射器にて取得した血液 5 mL を、15-mL 遠心管中の 5 mL Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich 社) 上に重層した。400 x g で 15 分間遠心分離を行い、Histopaque と血清の境界に現れる末梢血リンパ球の層をパスツールピペットにより集めた。この末梢血リンパ球を 6 穴プレート上の CEF に 1 x 10⁶ 細胞

／ウェルにて加え、37°C、4-5% CO₂ インキュベーター中で 6-7 日間程度培養し、HVT 特有のプラークを観察した。得られたウイルスを、サザンブロット法、ウェスタンブロット法にて解析した。

2-11 HVT/LT の鶏における安全性

18 日齢 SPF 鶏胚 (Charles River Laboratories 社) の卵内、または初日齢 SPF 鶏の頸部皮下に、過剰量 (30,000 pfu ; 通常量の 10 倍量) の HVT/LT を接種した。一群 50-65 羽を用い、対照群にはワクチン希釈液のみを投与した。この試験に用いる鶏が、マレック病に感受性であることを示すため、一群に、5 日齢にて MDV 強毒株である RB1B 株を投与し、50 日齢までマレック病の発症を観察した。RB1B 投与群以外の各群については、120 日齢まで飼育し、マレック病または伝染性喉頭気管炎に特徴的な、沈鬱、食欲減退、呼吸器症状などの臨床症状を観察した。120 日齢において、体重を測定し、HVT/LT 接種群と対照群の平均体重を Student の t 検定にて比較し、危険率 5%以下を有意水準とした。また解剖を行い、各臓器の肉眼病変を観察した。

2-12 HVT/LT の水平感染能の解析

18 日齢 SPF 鶏胚 (Charles River Laboratories 社) の卵内に、30,000 pfu の HVT/LT、または HVT 親株を接種した。孵化後、HVT/LT 群、HVT 親株群、それぞれ 25 羽を無作為に選び、群ごとに飼育用アイソレーターに入れた。それぞれのアイソレーターに非接種鶏 15 羽ずつを同居させ、21 日間飼育した。10 日齢、14 日齢、21 日齢にて採血し、HVT ウイルス分離を行った。具体的には、ヘパリン溶液を含む注射器にて取得した血液を 5 羽分ずつプールし、15-mL 遠心管中の同量の Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich 社) 上に重層した。400 x g で 15 分間遠心分離を行い、Histopaque と血清の境界に現れる末梢血リンパ球の層をパスツールピペットにより集めた。この末梢血リンパ球を 6 穴プレート上の CEF に 1×10^6

細胞／ウェルにて各サンプル 2 ウェルに加え、37°C、4-5% CO₂ インキュベーター中で 6-7 日間程度培養し、HVT 特有のプラークを観察した。

2-13 実験 1：伝染性喉頭気管炎に対する HVT/LT の防御効果（SPF 鶏）

初日齢の SPF 鶏（日生研）を、一群 10-14 羽となるように 4 群に分け、そのうち 2 群について、3000 pfu もしくは 1270 pfu の HVT/LT を頸部皮下にて接種した。また、1 群は 4 週齢にて市販の NDV 弱毒生ワクチン（CE 株；化学及血清療法研究所）を点眼接種し、生ワクチン対照群とした。残りの 1 群は非接種攻撃対照群とした。7 週齢に、全ての試験鶏の眼窩下洞に、 $10^{3.0}$ 50% 発育鶏卵感染価（EID₅₀）の強毒 ILTV 株（USDA 株）を接種し、攻撃した。その後、8 日間にわたり、鼻滲出物、結膜炎、開口呼吸等の伝染性喉頭気管炎特有の臨床症状を観察した。

2-14 実験 2：伝染性喉頭気管炎に対する HVT/LT の防御効果（市販ブロイラー鶏）

市販ブロイラー鶏（Ross 708 x Ross）を 2 群に分け、うち 1 群に対し、HVT/LT を約 3000 pfu 卵内接種（18 日齢鶏胚）した。残りの 1 群は非接種攻撃対照群とした。3 週齢または 5 週齢において、それぞれ各群 15 羽の鶏の眼窩下洞に、 $10^{3.5}$ EID₅₀ の強毒 ILTV 株（USDA 株）を接種し、攻撃した。その後、10 日間にわたり、鼻滲出物、結膜炎、開口呼吸等の伝染性喉頭気管炎特有の臨床症状を観察した。

第3節 結果及び考察

3-1 HVT/LT の構築とゲノム構造解析

HVT FC-126 株のゲノム DNA から、本研究に用いる挿入部位である *UL45* 遺伝子と *UL46* 遺伝子間の非翻訳部位の近傍領域を、PCR により取得してプラスミド、pUC18 に挿入し、p45/46Sfi を作製した。次に、ILTV 米国野外株 632 株から取得した *gB* 遺伝子の前半部分を *Pec* プロモーター、SV40 ポリ A シグナルと共に挿入部位に挿入し、さらに、マーカー遺伝子である *LacZ* 遺伝子を RSV プロモーターと共に挿入部位に加え、HVT/LT 構築用組換えプラスミド、p45/46PecILgBdellac (Fig. 1-1) を作製した。この組換えプラスミドを HVT FC-126 株の DNA と共に CEF に導入し、細胞内にて相同組み換えを起こさせることにより HVT/LT を作製した。混在している HVT 親株を除くため、 β -ガラクトシダーゼの活性を利用したカラーセレクション法によるスクリーニングを3回繰り返し、全てのプラークが青く染色されるクローンを得た。このクローンから抽出した DNA を用い、HVT 挿入部位を挟む領域を増幅するプライマーセットによる PCR を行い、HVT FC-126 親株（非組換え体）が存在しないことを確かめた（データ略）。

構築した HVT/LT のゲノム構造解析を、サザンブロット法にて行った。*gB* プローブを用いた試験では、HVT/LT と組換えプラスミドで 3.3 kb のバンドが検出され、HVT 親株ではバンドは検出されなかった (Fig. 1-2)。一方、HVT 挿入部位プローブを用いた場合は、HVT/LT と組換えプラスミドで 4.6 kb 及び 3.3 kb のバンドが検出され、HVT 親株においては 2.0 kb のバンドが検出された (Fig. 1-3)。これらの結果により、HVT/LT が意図した挿入部位である *UL45* 遺伝子と *UL46* 遺伝子の間に、ILTV *gB* 遺伝子を保持することが示された。

3-2 HVT/LT による抗原蛋白質発現の解析

HVT/LT による防御抗原蛋白質発現を、ウェスタンブロット法、及び IFA により解析した。まず、ウェスタンブロット法では、HVT/LT のレーンで、分子量約 60kDa の位置に、ILTV gB 蛋白質に由来すると考えられるバンドが検出された (Fig. 1-4)。一方、HVT 親株や非感染 CEF のレーンでは、同様のバンドは検出されなかった。

IFA においても、HVT/LT 感染細胞において、特異的な緑色の蛍光を発するウイルスプラークを観察することができた (Fig. 1-5A)。一方、HVT 親株ではこのような蛍光は観察されなかった (Fig. 1-5B)。これらの結果により、HVT/LT が ILTV gB 蛋白質を発現していることが明らかとなった。

3-3 HVT/LT の細胞内における増殖能の解析

HVT/LT と HVT 親株の細胞内における増殖曲線を比較したところ、HVT/LT は、HVT 親株と同程度の細胞内増殖速度を示した (Fig. 1-6)。従って、*UL45* 遺伝子と *UL46* 遺伝子間への外来遺伝子挿入は、HVT の細胞内増殖に影響を与えないことが明らかとなった。

3-4 HVT/LT の安定性

細胞内にて 20 代、または初日齢の SPF 鶏体内にて 5 代継代した HVT/LT を、サザンブロット法、ウェスタンブロット法にて解析したところ、継代前の HVT/LT と全く同一の結果が得られた (データ省略)。また、鶏体内にて 5 代継代した HVT/LT を接種した鶏で、全く臨床症状、臓器の肉眼病変が観察されなかったことから、HVT/LT の病原性が鶏での継代により上昇しないことが明らかとなった。以上の結果から、HVT/LT が遺伝的、表現型的に安定であることが明らかとなった。

3-5 HVT/LT の鶏における安全性

HVT/LT の鶏での安全性は、18 日齢の SPF 鶏胚の卵内、または初日齢の SPF 鶏の頸部皮下に、通常の 10 倍量である 30,000 pfu の HVT/LT を接種して評価した (Table 1-2)。MDV 強毒株である RB1B 投与群は 50 羽中 48 羽の鶏がマレック病を発症したことから、この試験で用いた SPF 鶏がマレック病に感受性であることが確かめられた。HVT/LT 接種鶏においては、120 日齢までの観察期間中、マレック病や伝染性喉頭気管炎に伴う臨床症状は全く認められず、解剖時にも肉眼病変は観察されなかった。また、120 日齢での HVT/LT 接種鶏の平均体重は、対照群の平均体重と統計的に差異が認められなかった。従って、HVT/LT が、対象動物である鶏において安全であることが明らかとなった。

3-6 HVT/LT の水平感染能の解析

HVT/LT が非接種鶏に水平感染するかどうかを調べるため、HVT/LT、または HVT 親株を卵内接種した SPF 鶏に、孵化後、非接種 SPF 鶏を同居させ、10 日齢、14 日齢、21 日齢にてウイルス分離を試みた。その結果、HVT/LT 接種鶏、及び HVT 親株接種鶏からは 10 日齢、14 日齢、21 日齢ともウイルスが分離されたが、HVT/LT 同居鶏、または HVT 親株同居鶏からは全くウイルスは分離されなかった (Table 1-3)。このことは、HVT/LT、HVT 親株が少なくとも 21 日齢まではワクチン接種鶏から非接種鶏に伝播しないことを示唆している。

HVT は羽嚢上皮細胞で増殖し (Handberg *et al.*, 2001; Zygraich & Huygelen, 1972)、また、鶏のふけから HVT DNA が検出されることが報告されている (Islam & Walkden-Brown, 2007; Islam *et al.*, 2008)。しかしながら、興味深いことに、HVT は鶏間で容易に伝播しないと考えられている (Cho & Kenzy, 1975; Islam *et al.*, 2008)。今回の結果も、HVT の鶏間での水平感染能が極めて限定的であることを支持している。

3-7 伝染性喉頭気管炎に対する HVT/LT の防御効果

HVT/LT の伝染性喉頭気管炎に対する防御効果を SPF 鶏及び市販ブロイラー鶏を用いて評価した。

まず、実験 1 において、初日齢の SPF 鶏に 3,000 pfu または 1,270 pfu の HVT/LT を接種した後、7 週齢にて強毒 ILTV 株である USDA 株で攻撃したところ、3,000 pfu 接種群で 14 羽すべてが、1,270 pfu 接種群では 13 羽中 12 羽 (92%) が防御した (Table 1-4)。一方、非接種攻撃対照群では、14 羽すべてが伝染性喉頭気管炎を発症した。また、生ワクチン対照群についてはすべての鶏が防御した。

次に、実験 2 にて、HVT/LT の市販ブロイラー鶏での防御効果を評価した。約 3,000 pfu の HVT/LT を 18 日齢鶏胚に卵内接種した後、3 週齢、または 5 週齢にて強毒 ILTV 株で攻撃した。その結果、3 週齢においてはすべての非接種攻撃対照群が伝染性喉頭気管炎を発症したのに対し、HVT/LT 接種群では 15 羽中 10 羽 (67%) が防御した (Table 1-5)。また、5 週齢においては、非接種攻撃対照群の 73% (15 羽中 11 羽) が発症したのに対し、HVT/LT 接種群では 15 羽中 13 羽 (87%) が防御した。

これらの結果により、HVT/LT が、SPF 鶏と市販ブロイラー鶏において防御効果を示すこと、また、市販ブロイラー鶏においては 3 週齢ですでに効果が認められることが明らかになった。

第 4 節 まとめ

本章においては、ILTV の糖蛋白質抗原のうち、gB 蛋白質をコードする遺伝子を HVT に挿入して rHVT を作製し、HVT/LT とした。この HVT/LT が、ILTV gB 蛋白質を発現することをウェスタンブロット法、及び IFA により明らかにした。また、HVT/LT の細胞内での増殖能は HVT 親株と同等であった。このことから、

本研究で用いた *UL45* 遺伝子と *UL46* 遺伝子間の遺伝子挿入部位が、細胞内増殖能に影響を与えないことが分かった。

次に、構築した HVT/LT は、遺伝的、表現的に安定であり、対象動物である鶏に過剰量を投与した際も、何ら副反応を示さないことを明らかにした。さらに、HVT/LT の水平感染能は限定されており、実験的に鶏内で5代継代した際も、病原性は上昇しなかった。最後に、HVT/LT が、SPF 鶏及び市販ブロイラー鶏にて、伝染性喉頭気管炎に対して有効な防御効果を示すことを明らかにした。

現行の伝染性喉頭気管炎生ワクチンは効果は高いものの、伝播能が高く、また鶏間で水平感染を繰り返すことにより病原性を増していくことが知られている。従って、本研究で構築した HVT/LT の特徴は、次世代伝染性喉頭気管炎ワクチンとして好ましいものであると言える。

Table 1-1. Sequences of primers.

Primer name	Sequences
P1	5'-CCCCGAATTCATGGAAGAAATTTCC-3'
P2	5'-CGCGGGCCTTATTGGCCAAAACACACCTCTAACGGTACT-3'
P3	5'-GCGCGGCCAATAAGGCCAAAACACAGTAACCGTTAGAGGT-3'
P4	5'-CCCCAAGCTTTCAAGTGATACTGCGTGA-3'
L1	5'-GAGGATCCATTGACATGGCTAGCTTGAAAATGCTG-3'
L2	5'-ACGGTACCCTTGGCGACGCTCTCTCCCT-3'
45/46-F	5'-TAGCGGCACGGAAACAGATAGAGA-3'
45/46-R	5'-TGGC GATACGGTTCCTGGTTTGAC-3'
gB-F	5'-GCACCGAAAGAACCCAGATTAGA-3'
gB-R	5'-ATCACCTGTCGCCATTCCAAAGTA-3'

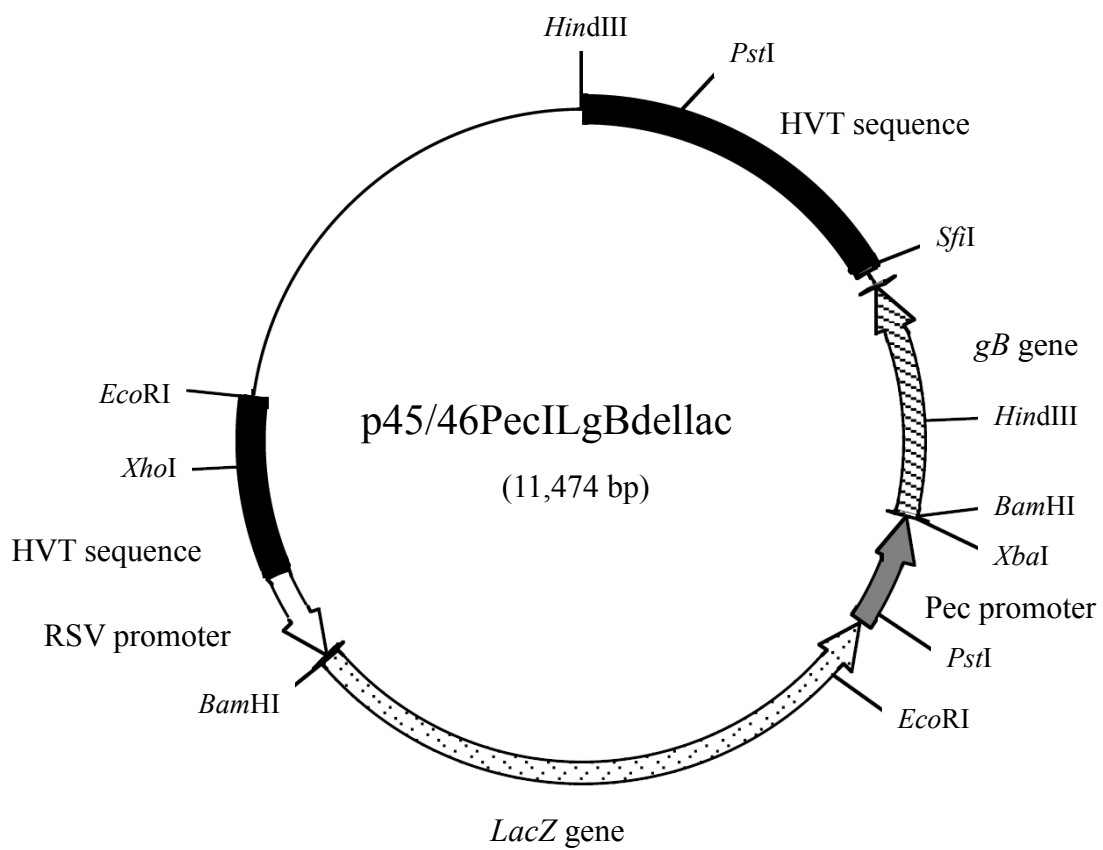


Fig. 1-1. A transfer plasmid for construction of HVT/LT, p45/46PecILgBdellac.

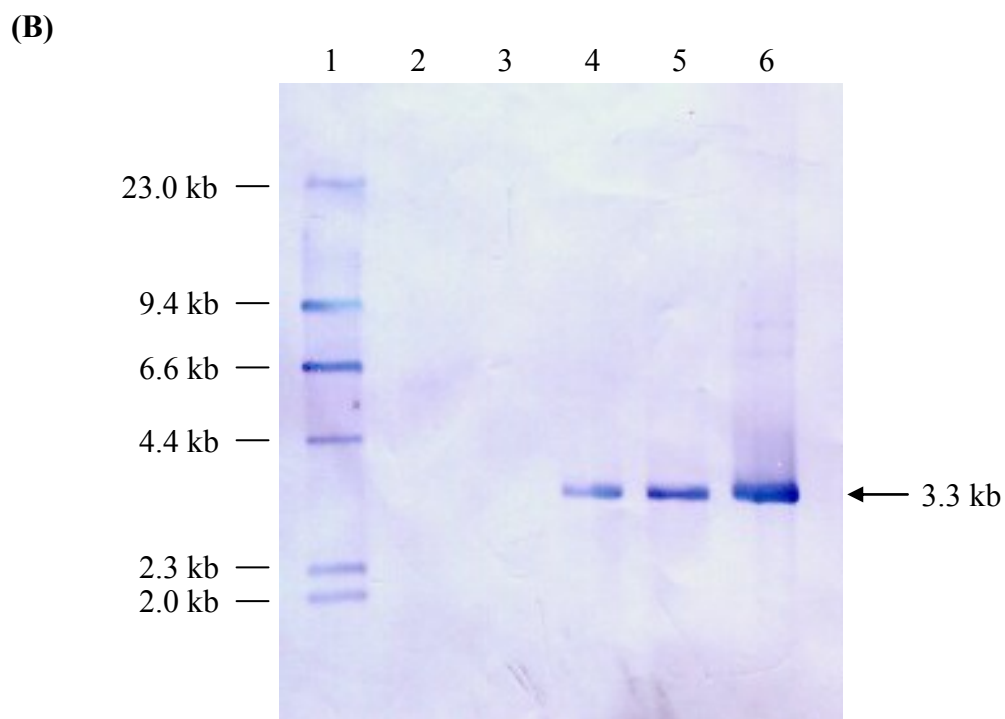
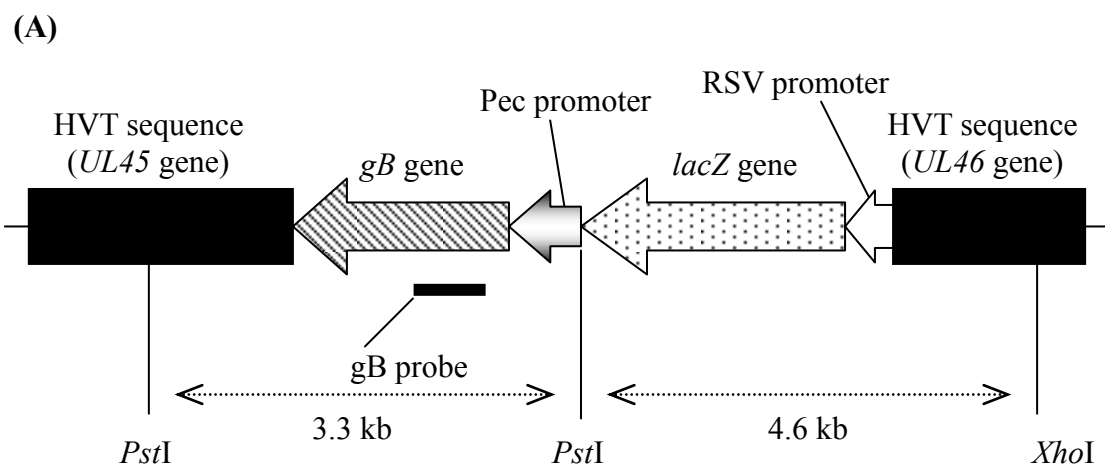


Fig. 1-2. Gene structure of HVT/LT and expected annealing site of the *gB* probe (A) and result of Southern blot using the *gB* probe (B). Lane 1 = DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche), Lane 2 = uninoculated CEF control, Lane 3 = HVT parent, Lane 4 = HVT/LT, Lane 5 = the fifth *in vitro* passage of HVT/LT, Lane 6 = transfer plasmid, p45/46PecILgBdellac.

(A)

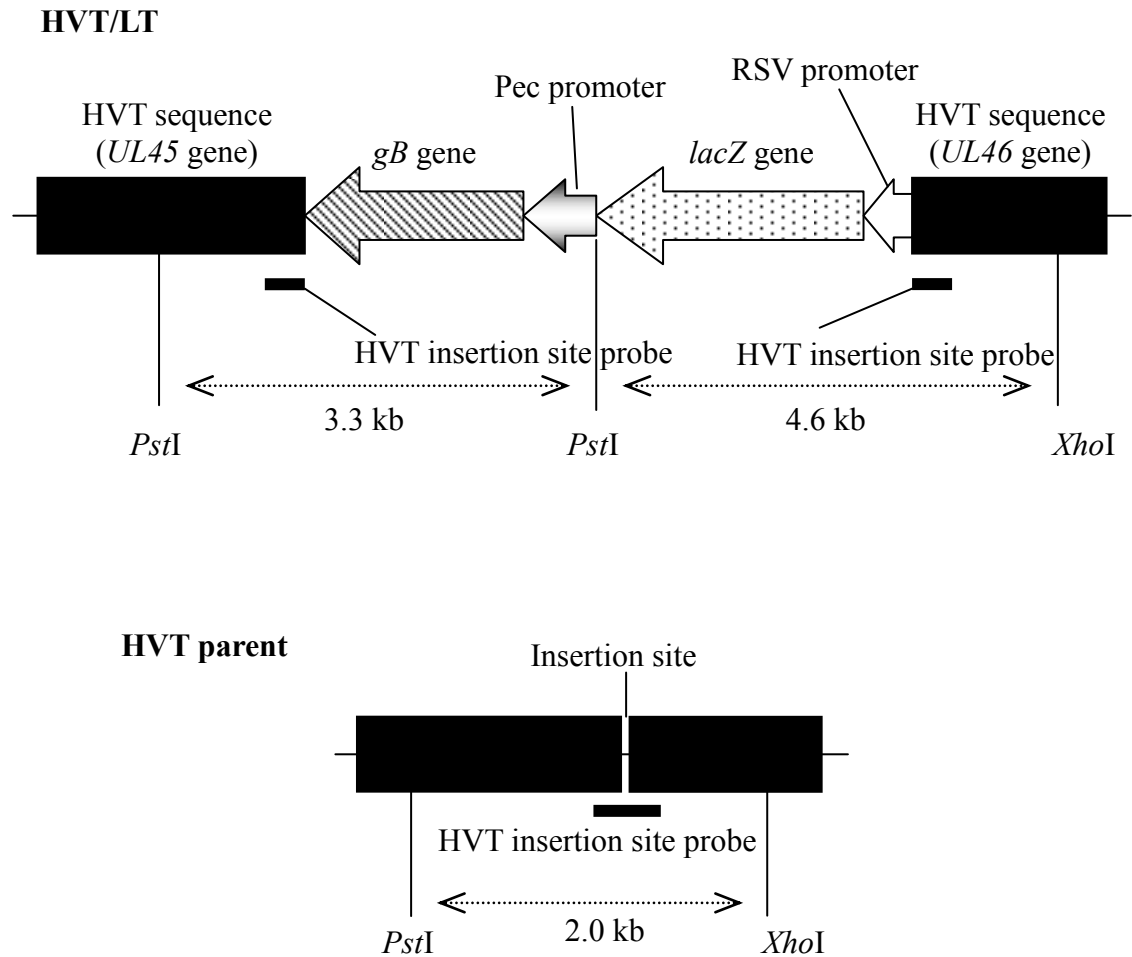


Fig. 1-3 (A). Gene structure of HVT/LT and HVT parent and expected annealing site of the HVT insertion site probe.

(B)

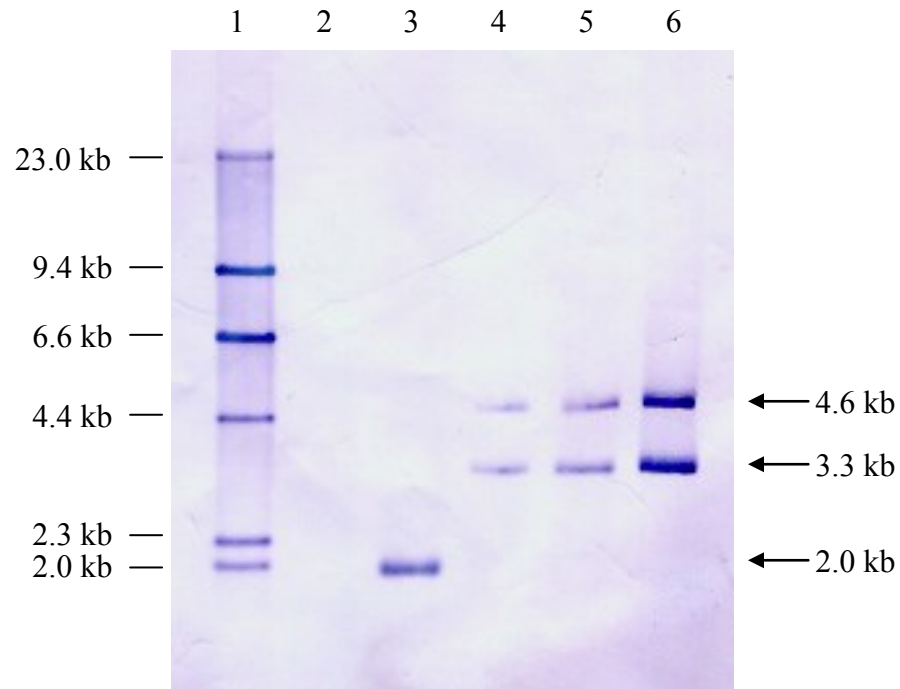


Fig. 1-3 (B). Result of Southern blot using the HVT insertion site probe. Lane 1 = DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche), Lane 2 = uninoculated CEF control, Lane 3 = HVT parent, Lane 4 = HVT/LT, Lane 5 = the fifth *in vitro* passage of HVT/LT, Lane 6 = transfer plasmid, p45/46PecILgBdellac.

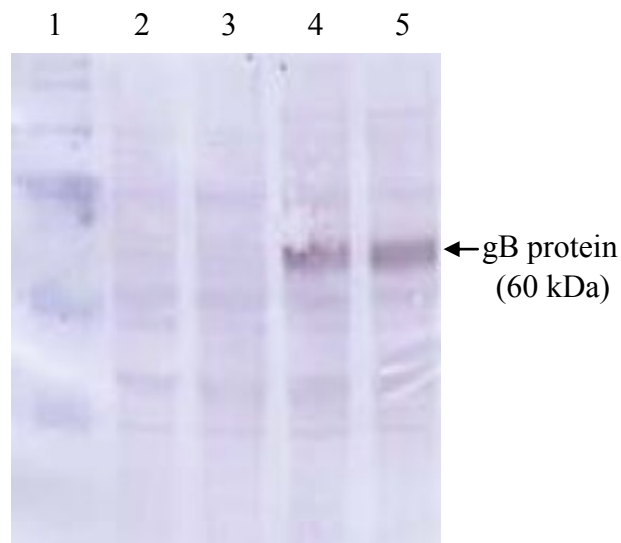
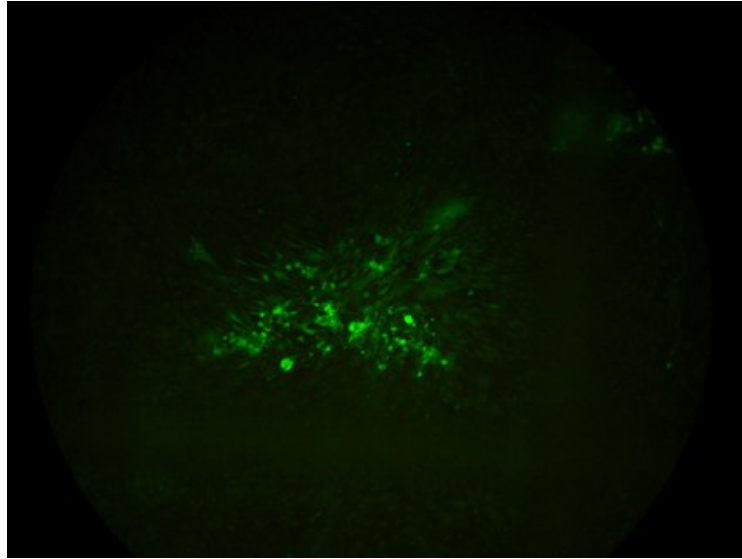


Fig. 1-4. Identification of the ILTV gB protein expressed by HVT/LT in western blot analysis using goat anti-ILTV gB sera. CEF infected with viruses were lysed and separated on 8% acrylamide gel. Separated proteins were blotted on PVDF membrane and reacted with the goat anti-ILTV gB serum, AP-labeled anti-goat IgG antibody, and then developed with BCIP/NBT. Lane 1 = Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories), Lane 2 = uninoculated CEF control, Lane 3 = HVT parent, Lane 4 = HVT/LT, Lane 5 = the fifth *in vitro* passage of HVT/LT.

(A)



(B)

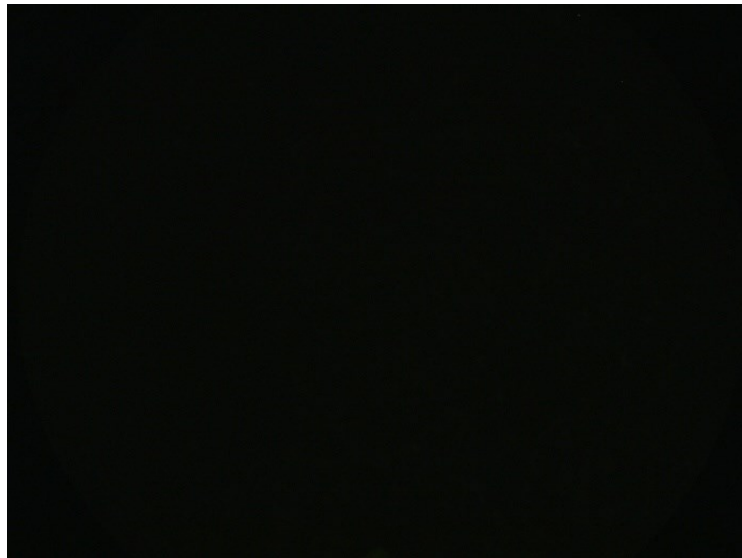


Fig. 1-5. Indirect immunofluorescence of CEF cells infected with (A) HVT/LT and (B) HVT parent. A CEF monolayer infected with HVT/LT or HVT parent was incubated for five days and fixed with methanol:acetone. The monolayer was reacted with goat anti-ILTV gB serum and then with FITC-labeled anti-goat IgG antibody, and observed under an inverted fluorescence microscope.

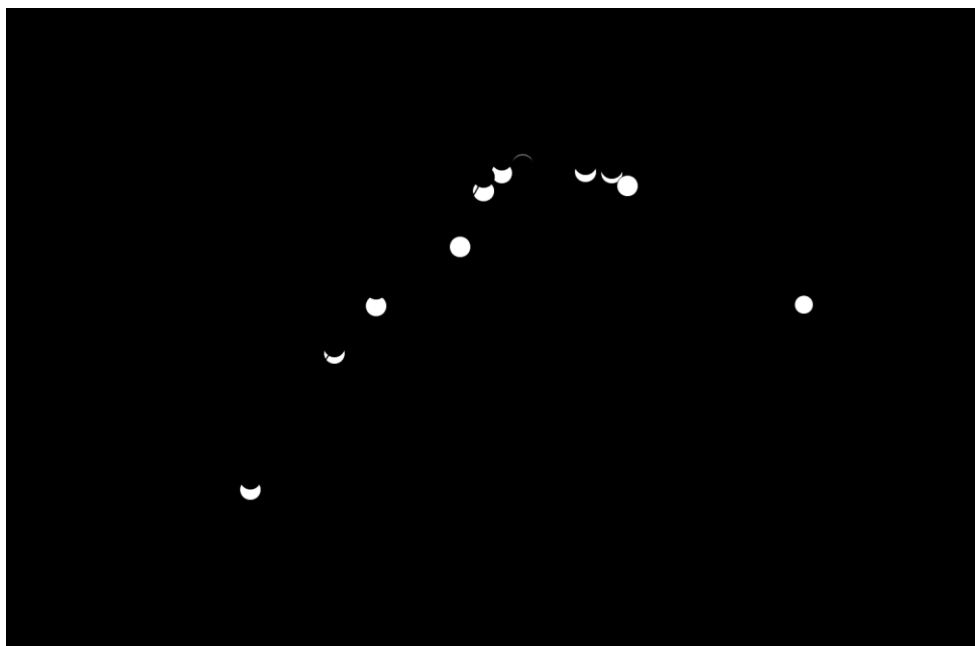


Fig. 1-6. *In vitro* growth kinetics of HVT/LT. Approximately 2000 pfu of HVT/LT or parental HVT FC-126 was inoculated on a CEF monolayer in a 100-millimeter tissue culture plates. Infected cells were harvested various times until 88 hours post inoculation and titrated on CEF.

Table 1-2. Safety of HVT/LT in the overdose study.

Group	Vaccine route	hatched/# embryos set (% hatchability)	# chicks set	Mortality ^A	# chickens with adverse reactions or clinical signs	# chickens with MD lesions	Average weight (kg)
HVT/LT	<i>In ovo</i>	61/65 (94%)	61	2 ^B (0)	0	0	1.575
HVT/LT	SQ	224/244 ^C (92%)	50	1 (0)	0	0	1.625
RB1B controls	Not applicable	224/244 (92%)	50	35 (33)	Not applicable	48	Not applicable
Negative controls	Sham <i>in ovo</i>	60/65 (92%)	60	0 (0)	0	0	1.614

^A Total mortality (# with gross MD lesions)

^B Two chickens in the *in ovo* group and one chicken in the SQ group died before the end of the observation period, but causes of deaths were determined to be unrelated to the vaccine.

^C Hatchability for all non-inoculated embryos was calculated together and chicks were divided into groups after hatch.

Table 1-3. Lack of horizontal transmission of HVT/LT.

Group	Virus isolation ^A		
	10 days of age	14 days of age	21 days of age
HVT/LT	5/5	5/5	5/5
Contact chickens for HVT/LT	0/3	0/3	0/3
Parental HVT	5/5	5/5	5/5
Contact chickens for parental HVT	0/3	0/3	0/3
Non-vaccinated controls	0/1	0/1	0/1

^A # of pools positive for CPE / # of total pools in the group. Blood from five chickens were pooled and inoculated on CEF.

Table 1-4. Efficacy of HVT/LT in SPF chickens.

Group	Positive/total ^A	% LT ^B
HVT/LT Vaccine 3000 pfu	0/14 _a	0%
HVT/LT Vaccine 1270 pfu	1/13 _a	8%
LTV live vaccine	0/10 _a	0%
Non-vaccinated challenge controls	14/14 _b	100%

^A Lowercase letters indicate a significant difference among groups by Fisher's exact test ($P < 0.05$).

^B % LT based on the number of chickens that showed clinical signs of LT divided by the number of challenged chickens x 100.

Table 1-5. Onset of efficacy of HVT/LT in commercial broiler chickens.

Group	Challenge at 3 weeks of age		Challenge at 5 weeks of age	
	Positive/total ^A	% LT ^B	Positive/total	% LT
HVT/LT	5/15 _a	33%	2/15 _a	13%
Non-vaccinated controls	15/15 _b	100%	11/15 _b	73%

^A Lowercase letters indicate a significant difference among groups by Fisher's exact test (P < 0.05).

^B % LT based on the number of chickens that showed clinical signs of LT divided by the number of challenged chickens x 100.

第2章 ニューカッスル病に対する組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクターの構築と評価

第1節 序論

ニューカッスル病は最も重要な鶏の疾病の一つとされており、世界中に分布して養鶏業界に多大な損失を与えている (Miller & Koch, 2013)。ニューカッスル病の病原因子である NDV は、パラミクソウイルス科、エイブラウイルス属に属するマイナス 1 本鎖 RNA ウイルスである。ニューカッスル病で認められる症状は、主に呼吸器症状、神経症状、下痢等が挙げられるが、NDV の株により出現する症状は大きく異なる。NDV 株は、引き起こす症状の種類と強さにより、5 つの病原性タイプ (pathotype) に分類される。すなわち、1) 内臓に病変を引き起こし高い致死率を伴う内臓向性強毒型 (viscerotropic velogenic)、2) 呼吸器及び神経症状を引き起こし高い致死率を伴う神経向性強毒型 (neurotropic velogenic)、3) 呼吸器症状を引き起こし低致死率を伴う中等毒型 (mesogenic)、4) 軽度の呼吸器症状を引き起こすあるいは不顕性感染する弱毒型 (lentogenic)、5) 内臓に不顕性感染する無病原性型 (asymptomatic-enteric) である (OIE, 2014)。なお、NDV はヒトにも感染し、結膜炎等の症状を引き起こすことがある (Miller & Koch, 2013)。すべての NDV は一つの血清型に属するが、遺伝子配列の分子系統解析によりいくつかの遺伝子型 (genotype) に分類されていることが知られており (Ballagi-Pordany *et al.*, 1996)、こうした遺伝的多様性が野外でのワクチン効果に影響を与えているかどうか、議論がなされている (Dortmans *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009)。

ニューカッスル病を制御する手段として、多くの国でワクチン接種が行われている (Senne *et al.*, 2004)。不活化ワクチンと、弱毒株を用いた生ワクチンが用いられており、一定の効果が得られているが、いくつかの問題点もある。まず、

生ワクチンには残留病原性があるものが多く、特に他の呼吸器病原体が共存する場合に急性の呼吸器症状を惹起するため、産卵率の低下や死亡率の増加へとつながる (Miller & Koch, 2013; Senne *et al.*, 2004)。また、親鶏から受け継がれる移行抗体がワクチンの効果に悪影響を与えることが知られている。さらに、現状では、一回のワクチン接種では十分な免疫を付与することができないため、複数回の投与が必要となる。特に長期間飼育される採卵鶏などでは、3 回以上の生ワクチンと不活化ワクチンを組み合わせたワクチン接種が行われる (Miller & Koch, 2013)。従来型の生ワクチン及び不活化ワクチンの接種が広く行われているにもかかわらず、世界各地でワクチン接種を受けた鶏群でのニューカッスル病の発生が報告されており (Dortmans *et al.*, 2012)、より安全でかつ効果が高く、また移行抗体の影響を受けにくい、新たなワクチンの開発が求められている。

NDV の表面蛋白質としては、fusion (F) 蛋白質と、hemagglutinin-neuraminidase (HN) 蛋白質の二つがあり、いずれも NDV に対する中和抗体を誘導し、防御抗原として作用することが知られている。また、F 蛋白質と HN 蛋白質の防御抗原としての効果を比較した実験により、F 蛋白質の方が高い効果を示すことが明らかにされている (Kumar *et al.*, 2011; Meulemans *et al.*, 1986)。これまでに、NDV *F* 遺伝子を鶏痘ウイルス、マレック病ウイルス、HVT などに挿入して、その効果を調べた例が報告されている (Boursnell *et al.*, 1990; Morgan *et al.* 1993; Reddy *et al.*, 1996; Sonoda *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 1990)。特に HVT では、Morgan らが PB1 株の US2 領域に RSV プロモーターに繋いだ NDV *F* 遺伝子を挿入した rHVT を作製し、NDV に対する効果が得られることを報告している (Morgan *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1993)。Reddy らは、NDV の *F* 遺伝子及び *HN* 遺伝子、さらに MDV の *glycoprotein A* 及び *B* 遺伝子を挿入した rHVT の NDV に対する効果を報告しているが、この rHVT の詳細は明らかにしていない (Reddy *et al.*, 1996)。

本章では、NDV *F* 蛋白質をコードする遺伝子を HVT に挿入して rHVT を作製した (以下 HVT/ND と略記する)。*F* 遺伝子発現の制御には、我々の研究グループが開発し、rHVT における IBDV *VP2* 遺伝子発現に有効であった *Pec* プロモ-

ターを使用した (Tsukamoto *et al.*, 2002)。まず、HVT/ND による NDV F 抗原蛋白質発現を解析した後、ニューカッスル病による防御効果について、異なる株に対する効果、免疫開始時期、免疫持続期間など、様々な観点から解析した。

第 2 節 実験材料及び実験方法

2-1 実験に用いたウイルス及び細胞

HVT FC-126 株 (Witter *et al.*, 1970) はアメリカ農務省 Avian Disease and Oncology Laboratory の R. L. Witter 博士から入手し、10-11 日齢 SPF 鶏胚から作製した CEF にて増殖させた。細胞の培養は、LM (+) 培地を用いて行った。MDV の強毒 RB1B 株 (Schat *et al.*, 1982) は、コーネル大学の K. A. Schat 博士から入手し、SPF 鶏にて増殖させた。NDV の神経向性強毒型 Texas GB 株 (genotype II)、及び弱毒型 B1 株 (genotype II) は、9-11 日齢 SPF 鶏胚の尿膜腔液にて増殖させた。

2-2 HVT/ND 構築用組換えプラスミドの作製

本節で使用したプライマーの配列は、Table 2-1 に記載した。NDV F 遺伝子は、水禽由来弱毒株である D26 株より取得した (Yamane *et al.*, 1978; Nagai *et al.*, 1980)。東京大学教養学部、川喜田正夫教授から譲渡された、NDV の F 遺伝子及び HN 遺伝子を含むプラスミド XLIII-10H (Sato *et al.*, 1987) をテンプレートとし、F1 プライマーと F2 プライマーにて PCR を行い、F 遺伝子を得た。この F 遺伝子の *Xba*I-*Kpn*I 断片を、pGI_{Pec} より切り出した *Pec* プロモーター (*Bgl*II-*Xba*I 断片)、及び pBK-CMV より取得した SV40 ポリ A シグナル配列 (*Kpn*I-*Sfi*I 断片) とともに、*Sfi*I で切断した p45/46_{Sfi} に挿入し、HVT/ND 構築用組換えプラスミド、p45/46_{Pec}F を作製した (Fig. 2-1)。

2-3 NDV F 蛋白質に対する抗体の作製

GST 融合 F 蛋白質を大腸菌にて発現させ、精製した。これをウサギに 3 回免疫した後、採血して血清を分離し、抗 NDV F 抗体とした。

2-4 組換えウイルスの構築

エレクトロポレーションの基本的な操作は第 1 章で示した通りに行った。スクリーニングは、F 蛋白質を発現するプラークのみを染色するブラックプラーク法にて行った。すなわち、2 枚のプレートのうち 1 枚をメタノール：アセトン混合液 (1:2) で固定し、ウサギ抗 NDV F 抗血清を加えてインキュベートした。次に、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories 社)、さらに続いて VECTASTAIN[®] ABC-AP kit (Vector Laboratories 社) を加えてインキュベートした後、BCIP/NBT 溶液を加えることにより、NDV F 蛋白質を発現するプラークを染色した。染色された rHVT のプラークを含むウェルに相当するレプリカプレート上のウェルから細胞をトリプシン処理により回収、希釈し、新たな CEF と混合して 96 穴プレートに分注することにより、一回目の純化を完了した。この純化過程を、全てのプラークがブラックプラーク法で染色することが確認できるまで繰り返した。得られたクローンから抽出した DNA を用いて、HVT 挿入部位を挟んだ領域を増幅するプライマーセット、45/46-F プライマーと 45/46-R プライマーにより PCR を行い、HVT FC-126 親株 (非組換え体) の存在の有無を検討した。

2-5 サザンブロット法

基本的な操作は第 1 章で示した通りに行った。ウイルス DNA を切断する制限酵素には、*Xho*I、*Xba*I、及び *Sfi*I を用いた。また、プローブには F プローブと HVT 挿入部位プローブを用いた。F プローブを作製するのに用いたプライマーセットは、F-F と F-R である。

2-6 ウェスタンブロット法

基本的な操作は第1章で示した通りに行った。1次抗体として、ウサギ抗NDV F抗血清、2次抗体として、AP標識抗ウサギIgG抗体（Bethyl社）を用いた。

2-7 IFA

基本的な操作は第1章で示した通りに行った。1次抗体として、ウサギ抗NDV F抗血清、2次抗体として、FITC標識抗ウサギIgG抗体（Sigma-Aldrich社）を用いた。

2-8 抗NDV血清抗体価の測定

抗NDV血清抗体価の評価は、酵素免疫測定法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA）及び赤血球凝集抑制（HI）試験により行った。ELISAについては市販のNDV ELISAキット（IDEXX Laboratories社）を使用し、製品添付書に指定された方法に従って測定することでタイターを算出した。陽性、陰性のカットオフタイター値は、396である。HI試験は、不活化したNDV LaSota株を赤血球凝集素として実施した。すなわち、HI試験に先立って、不活化LaSota抗原の赤血球凝集単位を、完全な赤血球凝集を示す最高希釈倍率として決定し、50 μ L中に10単位の抗原を含むように希釈した。U底96穴プレートを用い、まず血清をPBSで1:1に希釈した後、1ウェルあたり50 μ Lの血清希釈液を含むように2倍階段希釈した。10単位（50 μ L）の赤血球凝集素を各ウェルに加え、室温で45分静置した。最後に、50 μ Lの0.5%鶏赤血球を各ウェルに加え、室温で45分ほど静置した。HI価は、赤血球の凝集を抑制する血清の最高希釈倍率とした。

2-9 実験1：ニューカッスル病に対するHVT/NDの防御効果（SPF鶏）

18日齢SPF鶏胚（Charles River Laboratories社）の卵内、または初日齢SPF鶏の頸部皮下に、HVT/ND 700 pfuをMDV血清型2型の弱毒ワクチン株であるSB-1株 400 pfuと混合して接種した。1群はワクチン希釈液を投与し、攻撃対照

群とした。ワクチン接種群はそれぞれ 30 羽、対照群は 10 羽を用いた。24 日齢にて採血し、抗 NDV 血清抗体価を測定した。さらに、28 日齢にて全ての試験鶏の筋肉内に $10^{4.0}$ EID₅₀ の強毒 NDV 株 (Texas GB 株) を接種し、攻撃した。その後、14 日間に渡り、振戦、脚麻痺、頸部捻転等、この NDV 株特有の神経症状、及び死亡を観察した。

2-10 実験 2 : HVT/ND の市販ブロイラー鶏における免疫付与開始時期の解析

NDV に対する移行抗体を保持する市販ブロイラー鶏 (Ross 708 x Ross 708) の 18 日齢鶏胚に、HVT/ND 5,000 pfu を SB-1 株 3,000 pfu と混合して卵内接種した。対照群には HVT 親株 5,000 pfu を SB-1 株 3,000 pfu と混合して同じく卵内接種した。1 週齢から 5 週齢にかけて、毎週、各群 10 羽に弱毒株である NDV B1 株を点眼にて接種し、その 5 日後に気管スワブを採取して 9-11 日齢 SPF 鶏胚の漿尿膜内に接種することにより、ウイルス分離の有無を調べた。7 日後に漿尿液を採取し、血球凝集活性を調べるとともに、胚での急性出血、鬱血等の病変を観察した。7 日目以前に死亡した胚についても、血球凝集活性と病変観察を行った。気管スワブを接種した胚で、血球凝集活性、及び病変が認められなかった個体を NDV B1 株の増殖に対して防御したとみなした。

2-11 実験 3 : HVT/ND の市販採卵鶏における免疫持続期間の解析

初日齢のメス市販採卵鶏 (Buckeye Egg Farm) を 2 群に分け、1 群に HVT/ND 5,000 pfu を SB-1 1,500 pfu と混合して頸部皮下接種した。残りの 1 群を非接種攻撃対照群とした。19 週齢において、ワクチン接種群 40 羽、及び対照群 10 羽の筋肉内に $10^{4.0}$ EID₅₀ の強毒 NDV 株 (Texas GB 株) を接種して攻撃した。その後、14 日間にわたり、振戦、脚麻痺、頸部捻転等、この NDV 株特有の神経症状、及び死亡を観察した。また、同じく初日齢にて HVT/ND を接種した市販採卵鶏を 50 週齢まで飼育し、随時採血して抗 NDV 血清抗体価の推移を調べた。

第3節 結果及び考察

3-1 HVT/ND の構築とゲノム構造解析

NDV D26 株から取得した *F* 遺伝子を、Pec プロモーター、SV40 ポリ A シグナルと共に p45/46Sfi の挿入部位に挿入し、HVT/ND 構築用組換えプラスミド、p45/46PecF (Fig.2-1) を作製した。この組換えプラスミドを HVT FC-126 株の DNA と共に CEF に導入し、細胞内にて相同組み換えを起こさせることにより、HVT/ND を作製した。混在している HVT 親株を除くため、抗 NDV F 抗体を用いたブラックプラーク法によるスクリーニングを 3 回繰り返し、全てのプラークが F 蛋白質を発現するクローンを得た (Fig. 2-2)。PCR により、HVT FC-126 親株 (非組換え体) が存在しないことを確かめた。

構築した HVT/ND のゲノム構造の解析は、サザンブロット法を用いて行った。まず、F プロブを用いた試験では、HVT/ND と組換えプラスミドで 3.6 kb のバンドが検出されたのに対し、HVT 親株ではバンドは検出されなかった (Fig. 2-3)。一方、HVT 挿入部位プロブを用いた場合は、HVT/ND と組換えプラスミドで 3.6 kb 及び 1.2 kb のバンドが検出され、HVT 親株においては 2.3 kb のバンドが検出された (Fig. 2-4)。これらの結果により、HVT/ND が、意図した挿入部位に NDV *F* 遺伝子を保持することが明らかとなった。

3-2 HVT/ND による抗原蛋白質発現の解析

HVT/ND による防御抗原蛋白質発現を、ウェスタンブロット法、及び IFA により解析した。まず、ウェスタンブロット法では、HVT/ND のレーンで、分子量約 60kDa の位置にバンドが検出された (Fig. 2-5)。このバンドは、F 蛋白質の前駆体 (F_0) の分子量と一致する。F 蛋白質は、通常宿主プロテアーゼにより切断を受けて F_1 と F_2 に開裂され、生物活性を発現する (Miller & Koch, 2013)。しかしながら、弱毒株由来の F 蛋白質は CEF が持たないトリプシン様プロテアー

ゼのみで切断されるため、今回の実験では前駆体である分子量約 60kDa の F₀ が観察されたと考えられる。一方、HVT 親株や非感染 CEF のレーンでは、同様のバンドは検出されなかった。

IFA においても、HVT/ND 感染細胞において、特異的な緑色の蛍光を発するウイルスプラークを観察することができた (Fig. 2-6)。一方、HVT 親株ではこのような蛍光は観察されなかった。これらの結果により、HVT/ND が NDV F 蛋白質を発現していることが明らかになった。

3-3 HVT/ND の安定性、及び鶏における安全性

第 1 章と同様に、HVT/ND の細胞内、及び鶏体内での継代後の安定性、また、鶏での安全性を評価した。まず、細胞内にて 20 代、または初日齢の SPF 鶏体内にて 5 代継代した HVT/ND を、サザンブロット法、ウェスタンブロット法にて解析したところ、継代前と同一の結果が得られた (データ省略)。また、鶏内での継代による病原性上昇も認められなかったことから、HVT/ND が遺伝的、表現型的に安定であることが示された。

次に、HVT/ND の鶏での安全性は、18 日齢の SPF 鶏胚の卵内に、通常の 10 倍量である 30,000 pfu の HVT/ND を接種して評価した (Table 2-2)。MDV 強毒株である RB1B 投与群は 58 羽中 57 羽の鶏がマレック病を発症したことから、この試験で用いた SPF 鶏がマレック病に感受性であることが確かめられた。HVT/ND 接種鶏では、120 日齢までの観察期間中、マレック病やニューカッスル病に伴う臨床症状、及び解剖時の肉眼病変も観察されず、また、120 日齢での HVT/ND 接種鶏の平均体重は、対照群の平均体重と統計的に差異が認められなかった。従って、HVT/ND が、対象動物である鶏において安全であることが明らかになった。

3-4 ニューカッスル病に対する HVT/ND の免疫付与効果

HVT/ND の免疫付与効果を次のように検討した。まず実験 1 で SPF 鶏における血清抗体価上昇、及び強毒 NDV 株に対する防御効果を調べた後、実験 2 では、市販ブロイラー鶏を用いて、免疫開始時期の解析を行った。最後に実験 3 において、市販採卵鶏を用いた免疫持続期間の解析を行った。

実験 1 では、18 日齢 SPF 鶏胚の卵内、または初日齢 SPF 鶏の頸部皮下に HVT/ND を MDV 血清型 2 型 SB-1 株と混合して接種した。SB-1 株は HVT と混合して接種すると、マレック病に対して相乗的防御作用を示すことが知られており (Witter, 1982; Witter & Lee, 1984)、実際に農場においても HVT と SB-1 を混合して使用している例が多くみられるため、本試験でも HVT/ND と SB-1 株との混合ワクチンを使用した。

24 日齢において採血を行い、NDV ELISA 価及び NDV HI 価を調べたところ、ELISA 価、HI 価ともに HVT/ND 接種群で上昇が認められた (Table 2-3)。通常、NDV に対する HI 活性は、HN 蛋白質に対する抗体によって引き起こされると考えられている。今回の実験では、F 蛋白質のみを発現する HVT/ND で HI 価の上昇が認められた。これは NDV 表面に F 蛋白質と HN 蛋白質が存在することから、抗 F 蛋白質抗体が F 蛋白質と相互作用することで、間接的に HN 蛋白質にも影響を及ぼして血球凝集活性を失わせ、HI 価が上昇したと考えられる。同様の現象は他のグループからも報告されており、Kumar らは、NDV の F 蛋白質を発現する組換え avian paramyxovirus serotype 3 が、同じように NDV HI 活性を示したと報告している (Kumar *et al.*, 2011)。また、Tozawa らは、NDV と同じくパラミクソウイルス科に属する Sendai virus の F 蛋白質に対するモノクローナル抗体が、HI 活性を有することを報告している (Tozawa *et al.*, 1986)。

28 日齢にて強毒 NDV 株 (Texas GB 株) で攻撃したところ、攻撃対照群では 10 羽すべてがニューカッスル病を発症し、死亡したのに対し、HVT/ND 接種鶏では、卵内接種群が 97% (30 羽中 29 羽)、皮下接種群が 100% (30 羽中 30 羽) 防御した (Table 2-3)。

次に、実験2では、市販ブロイラー鶏を用いて検討を行った。この市販ブロイラー鶏の初日齢における平均NDV HI価を測定したところ、 $2^{5.36}$ であったことから、これらの鶏がNDVに対する移行抗体を保持していることが確かめられた。18日齢鶏胚にSB-1株と混合したHVT/NDを接種し、1週齢から5週齢にかけて毎週、弱毒NDV株を点眼投与し、気管におけるウイルス増殖抑制効果でワクチンの効果を評価した。この評価方法は、米国、日本などで見られる強毒NDV株がほとんど存在せず、弱毒NDV株が、単独、もしくは気管に存在する他の病原体との相乗作用により呼吸器症状を引き起こすという (Senne *et al.*, 2004) 状況を再現したものである。

その結果、HVT/ND+SB-1混合群では1週齢、2週齢ではほとんどNDV増殖抑制効果が認められなかったものの、3週齢では、60% (10羽中6羽) が防御した (Table 2-4)。この防御効果は、4週齢では90%、5週齢では100%まで上昇した。一方、攻撃対照群であるHVT親株+SB-1混合群では、1-5週の間、すべての鶏でNDVが増殖した。

最後に、実験3では、初日齢のメス市販採卵鶏にSB-1株と混合したHVT/NDを頸部皮下接種し、19週間飼育した後、強毒NDV株 (Texas GB株) で攻撃した。その結果、非接種攻撃対照群では10羽すべてがニューカッスル病を発症して死亡したが、HVT/ND+SB-1混合群では40羽すべてが防御した。また、同じく初日齢にHVT/NDを接種した市販採卵鶏を50週齢まで飼育し、血清抗体価の推移をNDV ELISAにて調べたところ、NDV抗体価は50週齢まで高いレベルで維持されていることが分かった (Fig. 2-7)。このように、長期間に渡ってHVT/NDの免疫が持続するのは、HVTが潜伏感染して鶏体内に長くとどまり (Calnek *et al.*, 1981)、免疫システムを持続的に刺激するためだと考えられる。

これらの結果により、HVT/NDがSPF鶏、市販ブロイラー鶏、市販採卵鶏において、ニューカッスル病に対して有効な免疫を付与できることを明らかにした。また、HVT/LTと同様、市販ブロイラー鶏において、3週齢から有効な免疫効果が発揮されることが明らかになった。さらに、市販採卵鶏において、初日

齢接種後、19 週齢で防御効果が見られること、また血清抗体価は少なくとも 50 週齢まで持続することが明らかになった。

第 4 節 まとめ

本章では、NDV の防御抗原遺伝子である *F* 遺伝子を HVT に挿入した rHVT、HVT/ND を構築した。この HVT/ND は、F 蛋白質を発現し、鶏においてニューカッスル病に対する免疫を誘導することを明らかにした。また、初日齢に対する一回の HVT/ND 接種後、防御免疫は少なくとも 19 週齢まで、また血清抗体価は少なくとも 50 週齢まで持続することを明らかにした。現行のワクチンが、十分な効果を発揮するのに複数回の接種を必要とすること、特に長期間飼育される採卵鶏では最低 3 回以上の接種が行われることを考慮すれば、HVT/ND のこの特徴は非常に好ましいものであると言える。さらに、HVT/ND は NDV に対する移行抗体を保有する鶏においても、有効な防御効果を示した。HVT は細胞随伴性ウイルスであり、感染細胞から非感染細胞への感染の進行は、通常細胞間の直接的な接触を通じて行われる。HVT/ND の場合においても、感染の進行が直接接触した細胞間で行われ、血中に存在する NDV に対する抗体の影響を受けなかったものと推測される。

また、HVT/LT と同様、HVT/ND は過剰投与した際も何らの副反応を示さず、さらに鶏体内での継代後も病原性は上昇しなかった。現行の生ワクチンは、その残留病原性が問題となっており、HVT/ND の安全性は大きなメリットであると考えられる。これらのことから、本研究により、HVT/ND が次世代ニューカッスル病ワクチンとして有望であることが明らかにされた。

Table 2-1. Sequences of primers.

Primer name	Sequences
F1	5'-GCTCTAGAATGGGCTCCAGATCTTCTACCAGGATCCC-3'
F2	5'-ACGGTACCTCACATTTTTGTAGTGGCCC-3'
F-F	5'-CTAGCA GTGGCAGTTGGGAAGAT-3'
F-R	5'-GTTAAGGCAGGGGAAGTG ATTTGT-3'

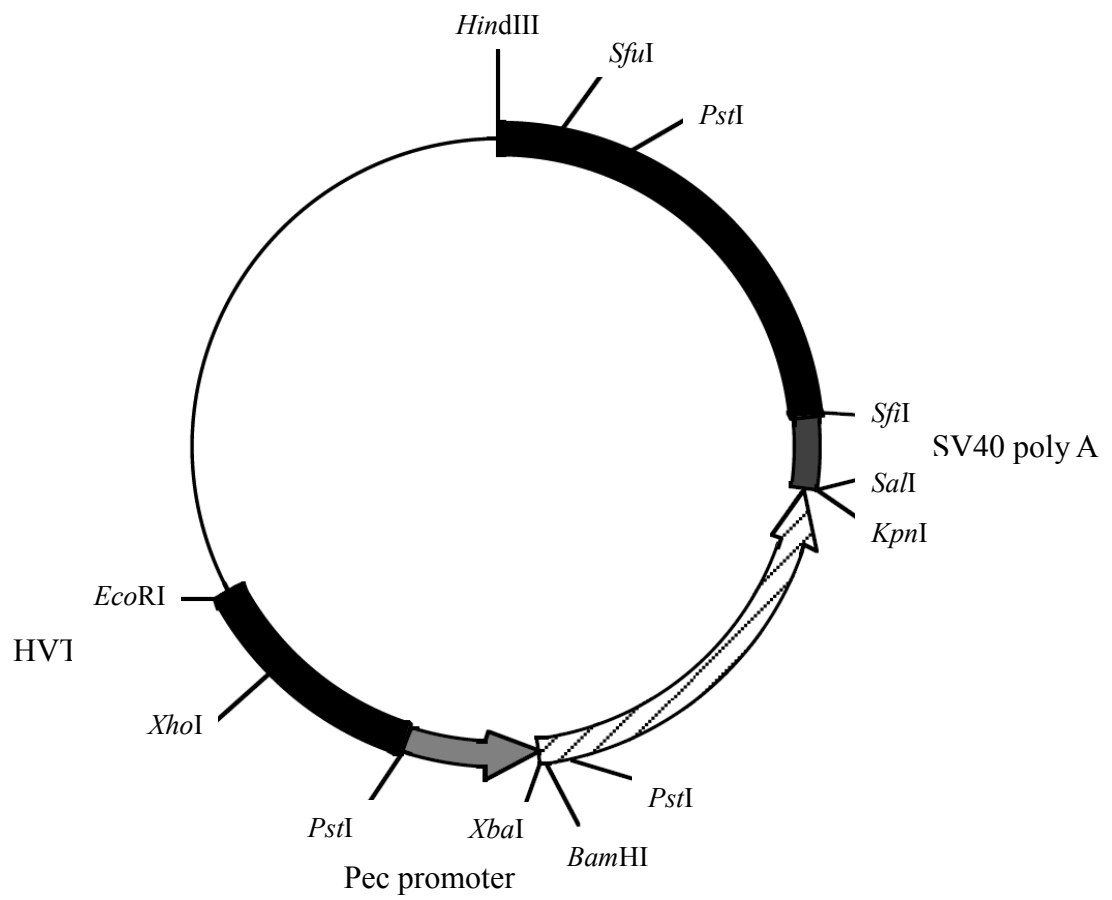


Fig. 2-1. A transfer plasmid for construction of HVT/ND, p45/46PecF.

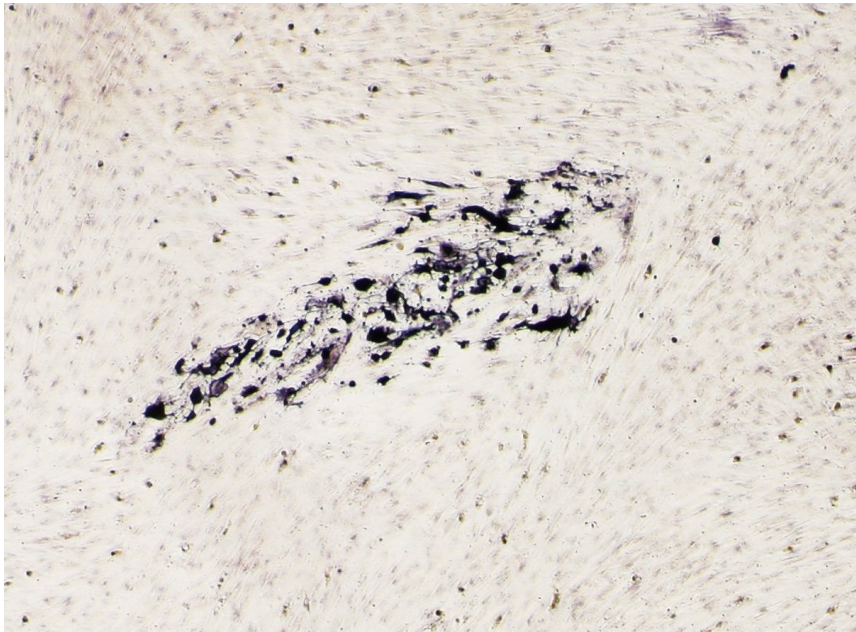


Fig. 2-2. Black plaque assay detecting expression of the NDV F protein by HVT/ND. CEF monolayer infected with HVT/ND was fixed with methanol:acetone. The monolayer with HVT/ND plaques was reacted with rabbit anti-NDV F serum, then with biotinylated anti-rabbit IgG antibody and finally with streptavidin-alkaline phosphatase conjugates. Plaques expressing F protein were stained by addition of BCIP/NBT solution.

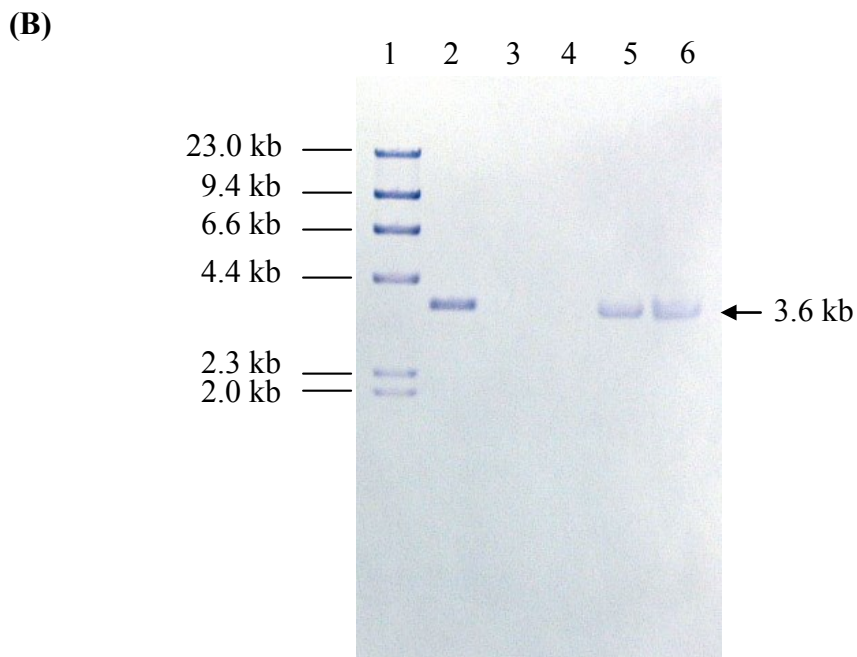
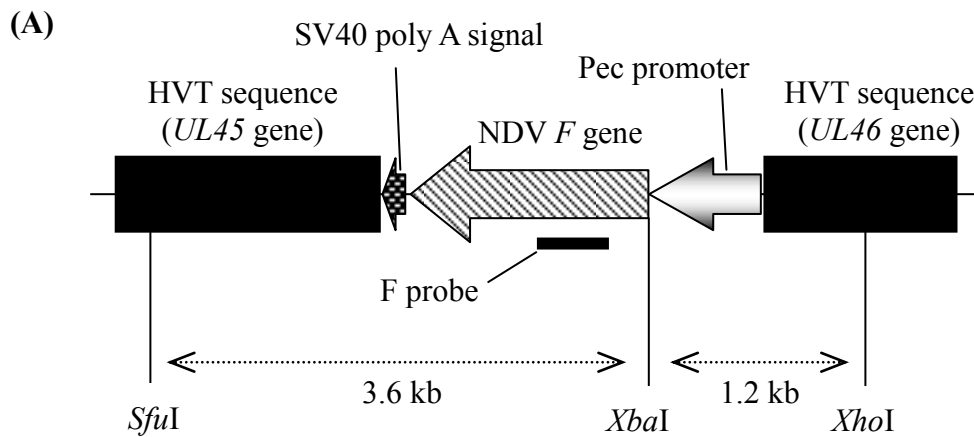
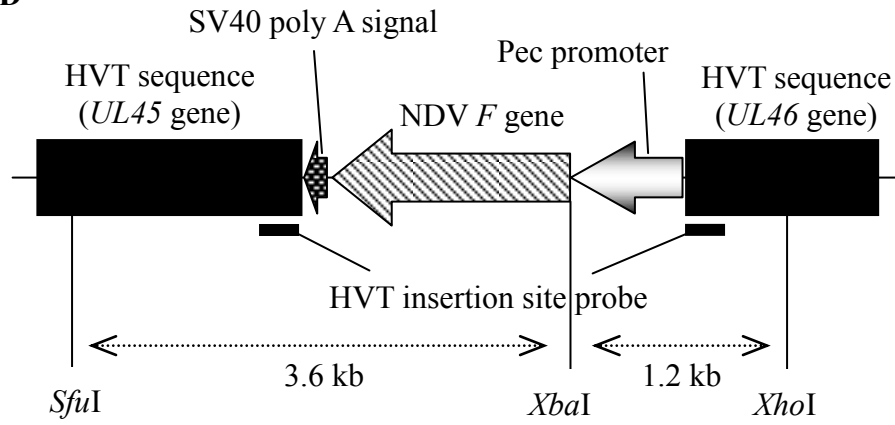


Fig. 2-3. Gene structure of HVT/ND and expected annealing site of the F probe (A) and result of Southern blot using the F probe (B). Lane 1 = DNA molecular weight marker II: DIG-labeled (Roche), Lane 2 = transfer plasmid: p45/46PecF, Lane 3 = uninoculated CEF control, Lane 4 = genomic HVT parent, Lane 5 = genomic HVT/ND, Lane 6 = genomic the fifth *in vitro* passage of HVT/ND.

(A)

HVT/ND



HVT parent

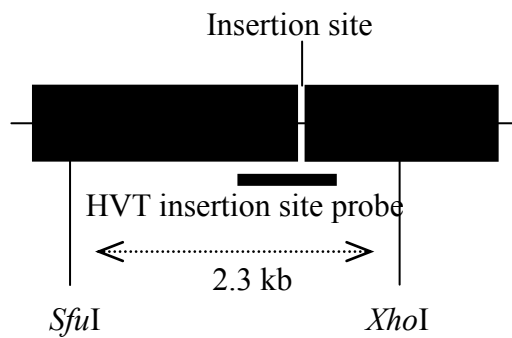


Fig. 2-4 (A). Gene structure of HVT/ND and HVT parent and expected annealing site of the HVT insertion site probe.

(B)

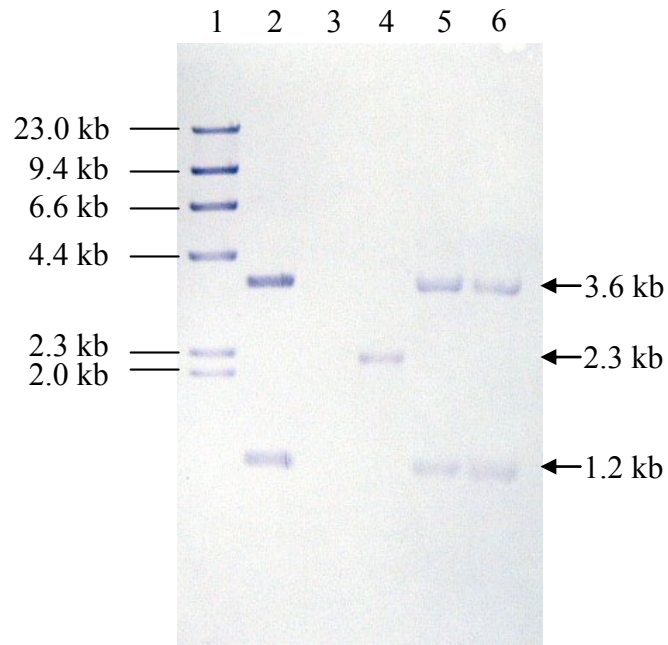


Fig. 2-4 (B). Result of Southern blot using the HVT insertion site probe. Lane 1 = DNA molecular weight marker II: DIG-labeled (Roche), Lane 2 = transfer plasmid: p45/46PecF, Lane 3 = uninoculated CEF control, Lane 4 = HVT parent, Lane 5 = HVT/ND, Lane 6 = the fifth *in vitro* passage of HVT/ND.

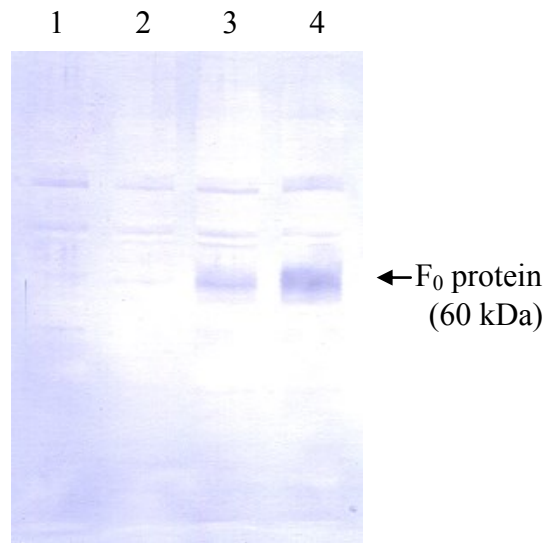


Fig. 2-5. Identification of the F protein expressed by HVT/ND in western blot analysis using rabbit anti-NDV F sera. CEF infected with viruses were lysed and separated on 8% acrylamide gel. Separated proteins were blotted on PVDF membrane and reacted with the rabbit anti-NDV F serum, AP-labeled anti-rabbit IgG antibody, and then developed with BCIP/NBT. Lane 1 = uninoculated CEF control, Lane 2 = HVT parent, Lane 3 = HVT/ND, Lane 4 = the fifth *in vitro* passage of HVT/ND. F₀ is an uncleaved precursor of F protein.

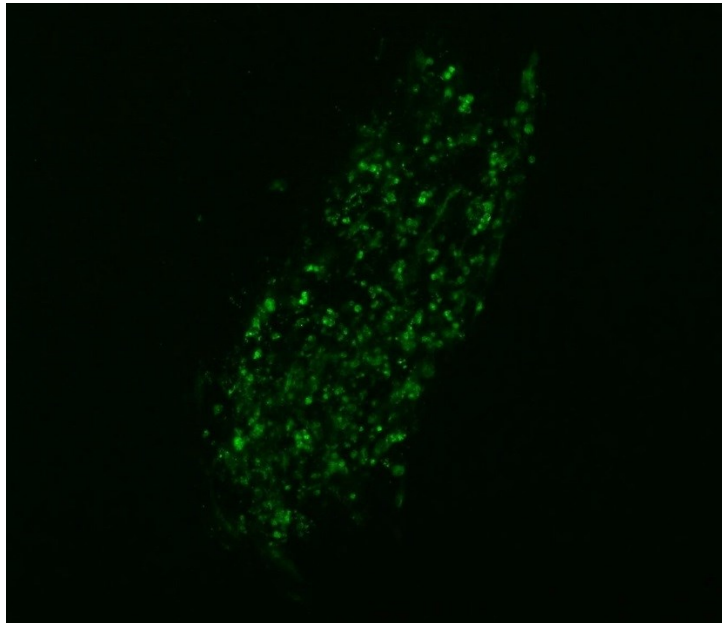


Fig. 2-6. Indirect immunofluorescence of CEF cells infected with HVT/ND. A CEF monolayer infected with HVT/ND was incubated for five days and fixed with methanol:acetone. The monolayer was reacted with rabbit anti-NDV F serum and then with FITC-labeled anti-rabbit IgG antibody, and observed under an inverted fluorescence microscope.

Table 2-2. Safety of HVT/ND in the overdose study.

Group	Vaccine route	hatched/# embryos set (% hatchability)	# chicks set	Mortality ^A	# chickens with adverse reactions or clinical signs	# chickens with MD lesions	Average weight (kg)
HVT/ND	<i>In ovo</i>	63/75 (84%)	63	5 ^B (0)	0	0	1.21
RB1B controls	Not applicable	58/75 (77%)	58	37 (37)	Not applicable	57	Not applicable
Negative controls	Sham <i>in ovo</i>	64/75 (85%)	64	2 ^C (0)	0	0	1.18

^A Total mortality (# with gross MD lesions)

^B Five chickens in the HVT group and two chicken in the negative controls died before the end of the observation period, but causes of deaths were determined to be unrelated to the vaccine (trauma).

Table 2-3. Efficacy of HVT/ND in SPF chickens against velogenic neurotropic NDV.

Group	Vaccine route	NDV ELISA			NDV challenge ^A	
		% Positive	Geometric mean titers	Geometric mean HI titer (log2)	Positive/total ^B	% Protection
HVT/ND + SB-1	<i>In ovo</i>	93%	1169	4.4 ± 0.97	1/30 _a	97%
HVT/ND + SB-1	SQ	87%	1484	4.1 ± 0.82	0/30 _a	100%
Mock-vaccinated	Mock	0%	1	1.0	10/10 _b	0%

^A Positive chickens showed neurologic signs typical of neurotropic ND such as tremors, loss of coordination and paralysis and died.

^B Lowercase letters indicate a significant difference among groups by Fisher's exact test (P < 0.05).

Table 2-4. Initiation of protection by HVT/ND evaluated by respiratory challenge with a low virulent NDV strain.

Group	% Protection ^A				
	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
Parental HVT + SB-1	0%	0%	0%	0%	0%
HVT/ND + SB-1	0%	10%	60%	90%	100%

^A Chickens were considered protected if embryos inoculated with tracheal swabs were negative for mortality, HA activity and lesions.

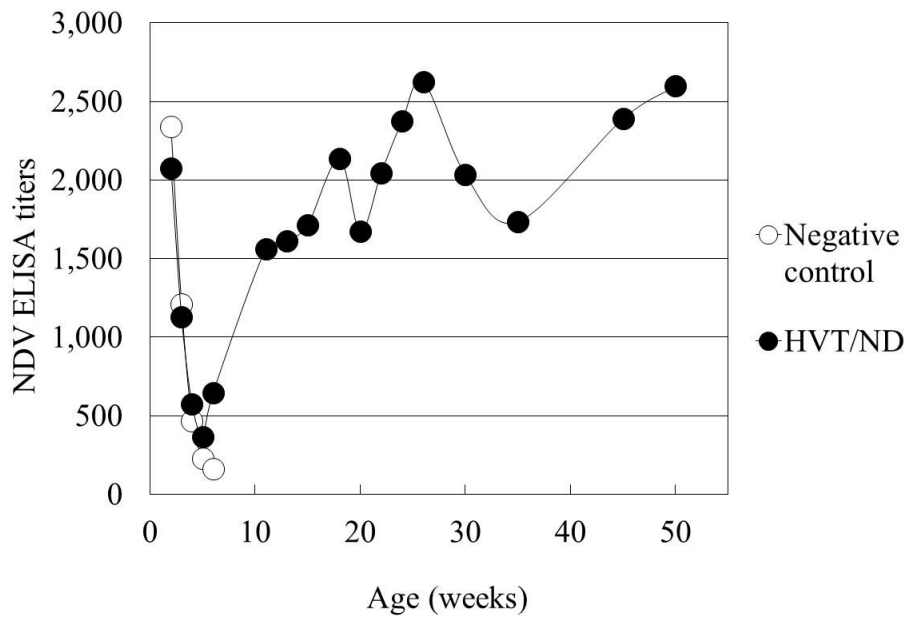


Fig. 2-7. NDV ELISA titers induced by HVT/ND through 50 weeks of age in commercial layer chickens. NDV ELISA titer was evaluated by a commercial NDV ELISA kit (IDEXX Laboratories).

第3章 トリインフルエンザに対する組換え七面鳥ヘルペスウイルスベクターの構築と評価

第1節 序論

トリインフルエンザは、オルトミクソウイルス科 A 型インフルエンザウイルス属に分類される AIV により引き起こされる (Swayne *et al.*, 2013)。AIV のゲノムは一本鎖マイナス鎖 RNA の 8 本の分節からなるが、それらにコードされる 10 種類の蛋白質のうち、ウイルス表面に存在する hemagglutinin (HA) 蛋白質と neuraminidase (NA) 蛋白質が重要な抗原蛋白質であると考えられている。A 型インフルエンザウイルスは、16 種類の HA 蛋白質と 9 種類の NA 蛋白質の抗原性に基づいて、多くの亜型 (H5N1 亜型、H7N2 亜型など) に分類されている。また、AIV はその病原性に基づいて、高病原性 AIV と低病原性 AIV の 2 つの病原性に分類される。ほとんどの AIV は低病原性であるが、いくつかの H5 もしくは H7 亜型のウイルスは致死率の高い激しい全身性疾患を引き起こす。AIV の最も重要な病原性決定因子は、HA 蛋白質の開裂部位の配列である (Swayne *et al.*, 2013)。NDV の F 蛋白質と同様、HA 蛋白質は宿主のプロテアーゼによって HA1 蛋白質と HA2 蛋白質に開裂される。この HA 蛋白質の開裂は、AIV の感染能に必須である。低病原性株 HA 蛋白質の開裂部位は、通常 1 個の塩基性アミノ酸を持ち、気道や腸管の上皮細胞など、局所的に分布するトリプシン様プロテアーゼにより開裂される。従って、低病原性 AIV 株の増殖は、気道や腸管に限定される。一方、高病原性株の HA 蛋白質は、複数の塩基性アミノ酸を開裂部位に持ち、全身に分布するフリンプロテアーゼによって開裂される。従って、高病原性 AIV 株は全身で増殖し、全身性疾患を引き起こす。

トリインフルエンザは、重要な人獣共通感染症の 1 つであり、1996 年に発生した H5N1 亜型の流行で多数の死者が出たように、社会の大きな脅威となって

いる。この流行では、中国、東南アジアからヨーロッパ、中東、アフリカなど世界各地に広がりを見せ、現在でも中国、ベトナム、エジプトなどでは風土病化 (endemic) している (FAO, 2011)。1996 年以降、H5N1 亜型ウイルスは、ウイルス遺伝子に起こる突然変異の蓄積による連続抗原変異 (antigenic drift) を起こしており、HA 遺伝子の分子系統学解析によりいくつもの分岐群 (クレード; clade) に分けられている (Group WOFHNEW, 2008)。

トリインフルエンザの制御と根絶のためには、感染した鶏の淘汰を含む厳格なバイオセキュリティプログラムの遂行が最優先で行われる。しかしながら、近年のトリインフルエンザの流行、特に H5N1 亜型ウイルスの流行では、国によっては感染鶏の淘汰に伴う経済的損失が莫大で受容できないこと、またいわゆる backyard chicken (個人の庭で飼育されている鶏) が広く存在していることなどの理由から、大規模な感染鶏淘汰は実現可能でない場合がある。そのような状況においては、ワクチン接種はトリインフルエンザ根絶及び制御計画を支える適切で効果的な手段として考えられている (Capua & Alexander, 2008; Sims, 2007; Swayne, 2012)。適切に使用した場合、トリインフルエンザワクチンは家禽類をトリインフルエンザの症状及び致死から防御すること、また、ワクチン接種鶏においてウイルスの環境放出を著しく抑制し、それによりウイルスの伝播を減少させることが示されている (Swayne, 2003)。現在市販されている H5 亜型トリインフルエンザワクチンは、油性アジュバンドを加えた不活化ワクチンと組換え鶏痘ウイルスベクターワクチン、及び組換え NDV ベクターワクチンである。しかしながら、その効果は充分とは言えず、特に、同じ亜型であっても抗原性が異なる AIV 株に対して効果を発揮できないことが示されている

(Abdelwhab *et al.*, 2011; Swayne & Kapczynski, 2008)。また、移行抗体によるこれらのワクチン効果への影響も指摘されている。なお、トリインフルエンザ根絶及び制御計画においてワクチンを使用する際には、調査目的のために、ワクチン接種された鳥が野外ウイルスに感染した鳥から区別できること (DIVA ; differentiating infected from vaccinated animals) が重要と考えられている。

従って、抗原性の異なる AIV 株に対しても効果を発揮でき、移行抗体の影響を受けない、さらに DIVA への応用が容易に可能な新しいトリインフルエンザワクチンの開発が望まれている。そこで本章では、現在最も問題となっている AIV H5 亜型の HA 蛋白質をコードする遺伝子を HVT に挿入して rHVT を作製した（以下 HVT/AI と略記する）。まず、HA 遺伝子発現を制御するのに適したプロモーターを見出すため、3 種の異なるプロモーターを使用した HVT/AI を作製し、そのトリインフルエンザに対する液性免疫誘導能を比較した。次に、HVT/AI の強毒 AIV 株（H5 亜型）に対する防御効果を調べた。

第 2 節 実験材料及び実験方法

2-1 実験に用いたウイルス及び細胞

HVT FC-126 株（Witter *et al.*, 1970）はアメリカ農務省 Avian Disease and Oncology Laboratory の R. L. Witter 博士から入手し、10-11 日齢 SPF 鶏胚から作製した CEF にて増殖させた。細胞の培養は、LM (+) 培地を用いて行った。MDV の強毒株である RB1B 株（Schat *et al.*, 1982）は、コーネル大学の K. A. Schat 博士から入手し、SPF 鶏にて増殖させた。高病原性 AIV、A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1; clade 2.2) 株、A/chicken/West Java Sbg/29/2007 (H5N1; clade 2.1.3) 株、及び A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) 株は、9-11 日齢 SPF 鶏胚の尿膜腔液にて増殖させた。

2-2 HVT/AI 構築用組換えプラスミドの作製

本節で使用したプライマーの配列は、Table 3-1 に記載した。AIV HA 遺伝子は、A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株、及び A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株より取得した。A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株は、clade 2.2 に属する。A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株については SPF 鶏胚の漿尿膜で増殖させた後、

RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて全ゲノム RNA を抽出した。SuperScript[®] First-Strand System for RT-PCR (Life Technologies 社) を用いて cDNA を合成した後、得られた cDNA をテンプレートとして、BamHA-F プライマーと SalHA-R プライマーにて PCR を行い、HA 遺伝子を取得した。一方、A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株については、PCR にて、HA 蛋白質の開裂部位の配列を低病原性株特有の配列に変更した。まず、A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株と同様に合成した cDNA をテンプレートとし、BamHA-F/Hu プライマーと H5avirCS-R プライマー、及び H5avirCS-F プライマーと Sa/HA-R/Hu プライマーをそれぞれ用いた PCR を行い、次に、2 つの PCR 産物を混合したものをテンプレートとして、BamHA-F/Hu と Sa/HA-R/Hu プライマーにて PCR を行うことにより目的断片を得た。

次に、pBK-CMV から PCR で取得した CMV プロモーター断片を *Pst*I と *Xba*I で処理し、pUC18 に挿入してプラスミド pGICMV(-) を構築した。さらに、同じく pBK-CMV から PCR で取得した SV40 ポリ A シグナルを含む PCR 産物を *Sal*I と *Sfi*I で処理し、pGICMV(-) に挿入して pGICMVpA を得た。CMV プロモーターと SV40 ポリ A シグナルを pGICMVpA から *Bgl*II を用いて切り出し、*Sfi*I で処理した p45/46Sfi に挿入して p45/46CMVpA を構築した。

Bac プロモーターは、CEF のゲノム DNA をテンプレートとして、PrBac1 プライマーと PrBac2' プライマーを用いた PCR により取得した。得られた断片を *Pst*I と *Xba*I で切り出し、pUC18 に挿入して pGIBac2 とした後、*Sal*I 及び *Sfi*I で処理した SV40 ポリ A シグナルを挿入して pGIBacpA2nd を得た。さらに、Bac プロモーターと SV40 ポリ A シグナルを pGIBacpA2nd から *Bgl*II を用いて切り出し、*Sfi*I で処理した p45/46Sfi に挿入して p45/46BacpA を構築した。また、Pec プロモーターを pGIPec から *Pst*I と *Bam*HI を用いて切り出し、その断片を p45/46BacpA2nd に挿入して p45/46PecpA2nd とした。

続いて、*Sal*I 及び *Bam*HI で処理した A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株の HA 遺伝子を p45/46CMVpA、p45/46BacpA、p45/46PecpA2nd にそれぞれ挿入し、

HVT/AI 構築用組換えプラスミド p45CMVH5Wis68 (Fig. 3-1A)、p45BacH5Wis68 (Fig. 3-1B)、p45PecH5Wis68 (Fig. 3-1C) を得た。A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株由来の HA 遺伝子については、p45/46CMVpA のみに挿入し、組換えプラスミド p45CMVH5HUNMod4999 (Fig. 3-1D) を得た。

2-3 AIV (H5 亜型) HA 蛋白質に対する抗体の作製

3 週齢の SPF 鶏に Lipofectin[®] Transfection Reagent (Life Technologies 社) と混合した AIV (H5 亜型) HA 蛋白質発現プラスミド 100 µg を筋肉内注射した後、4 週間隔で 2 回ブーストした。最終免疫の 3 週後に全採血して血清を分離し、抗 AIV (H5 亜型) HA 抗体とした。

2-4 組換えウイルスの構築

組換えウイルス構築、スクリーニングの基本的な操作は第 1 章で示した通りに行った。スクリーニングには、ニワトリ抗 AIV (H5 亜型) HA 抗血清を用いたブラックプラーク法にて行った。

2-5 サザンブロット法

基本的な操作は第 1 章で示した通りに行った。ウイルス DNA を切断する制限酵素には、*EcoRI*、及び *PvuI* を用いた。また、プローブには HA プローブと HVT 挿入部位プローブを用いた。HA プローブを作製するのに用いたプライマーセットは、HA1-P-F と HA1-P-R である。

2-6 ウェスタンブロット法

基本的な操作は第 1 章で示した通りに行った。1 次抗体として、ニワトリ抗 AIV (H5 亜型) HA 抗血清、2 次抗体として、AP 標識抗ニワトリ IgG 抗体 (Bethyl 社) と用いた。

2-7 IFA

基本的な操作は第1章で示した通りに行った。1次抗体として、ニワトリ抗AIV（H5亜型）HA抗血清、2次抗体として、FITC標識抗ニワトリIgG抗体（Sigma-Aldrich社）を用いた。

2-8 抗AIV血清抗体価の測定

抗AIV血清抗体価は、HI試験とAIV ELISAにて評価した。AIV HI試験は、A/turkey/Wisconsin/68（H5N9）株を用いた不活化AIウイルス抗原4単位を赤血球凝集素とし、国際獣疫事務局（OIE）が定める標準的な方法（OIE, 2014）に従って行った。すなわち、HI試験に先立って、不活化A/turkey/Wisconsin/68（H5N9）抗原の赤血球凝集単位を、完全な赤血球凝集を示す最高希釈倍率として決定し、25 μ L中に4単位の抗原を含むように希釈した。U底96穴プレートを用い、まず血清をPBSで1:5に希釈した後、1ウェルあたり25 μ Lの血清希釈液を含むように2倍階段希釈した。4単位（25 μ L）の赤血球凝集素を各ウェルに加え、室温で30分間静置した。最後に、50 μ Lの0.5%鶏赤血球（PBSにて希釈）を各ウェルに加え、室温で40分間ほど静置した。HI価は、赤血球の凝集を抑制する血清の最高希釈倍率とし、10以上のHI価を陽性とみなした。ELISAは、2種類の市販AIV ELISAキット、FlockChekTM AIV Ab kit（IDEXX Laboratories社）、及びProFLOK[®] AIV Ab test kit（Synbiotics社）を用いた。方法は、製品添付書に指定された方法に従った。FlockChekTM AIV Ab kitについては、S/P比が0.5以上の場合に陽性と判定する。一方、ProFLOK[®] AIV Ab test kitではELISAタイターが570以上の場合に陽性と判定する。

2-9 実験1：HVT/AIに用いるプロモーター評価

初日齢のSPF鶏（Charles River Laboratories社）を5群に分け、1群から3群までは、それぞれ約3000 pfuのHVT/AI-cmv、HVT/AI-bac、またはHVT/AI-pec（Table 3-2）を接種した。4群は、陽性対照群として、不活化したAIV

A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) ワクチンを 3 週齢にて皮下接種した。5 群は非接種対照群とした。尚、1 群から 4 群までは各群 17 羽、5 群の非接種対照群には 10 羽を用いた。3 週齢から 7 週齢にかけて毎週採血を行い、得られた血清を AIV HI 試験、及び AIV ELISA にて評価した。各群の抗体価の統計的な比較は SigmaStat ソフトウェア (SPSS 社) を用い、分散分析法を行った後、有意差が検出された場合には Tukey の方法により多重比較検定を実施し、危険率 5%以下を有意水準とした。

2-10 実験 2 : HVT/AI の高病原性 AIV に対する防御効果

初日齢の SPF 鶏 (Charles River Laboratories 社) に HVT/AI-Hu (Table 3-2) 約 1500 pfu を接種した後、4-6 週齢の間に、 $10^{6.0}$ EID₅₀ の高病原性 AIV 株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1) 株 (clade 2.2)、A/chicken/West Java Sbg/29/2007 (H5N1) 株 (clade 2.1.3)、A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) 株のいずれか) を点鼻にて接種し、攻撃した。その後、14 日間にわたり、沈鬱、神経症状など、高病原性トリインフルエンザ特有の臨床症状、及び死亡を観察した。

第 3 節 結果及び考察

3-1 HVT/AI の構築とゲノム構造解析

まず、A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株から取得した *HA* 遺伝子を、CMV プロモーター、Bac プロモーター、または Pec プロモーターのうちいずれかと、SV40 ポリ A シグナルと共に p45/46Sfi の挿入部位に挿入し、HVT/AI 構築用組換えプラスミド、p45CMVH5Wis68 (Fig. 3-1A)、p45BacH5Wis68 (Fig. 3-1B)、p45PecH5Wis68 (Fig. 3-1C) を得た。さらに、A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株から取得した *HA* 遺伝子を、CMV プロモーターと SV40 ポリ A シグナルと共に p45/46Sfi の挿入部位に挿入し、組換えプラスミド、p45CMVH5HUNMod4999

(Fig. 3-1D) を得た。これらの組換えプラスミドを HVT FC-126 株の DNA と共に CEF に導入し、細胞内にて相同組み換えを起こさせることにより、HVT/AI を作製した。混在している HVT 親株を除くため、抗 AIV (H5 亜型) HA 抗体を用いたブラックプラーク法によるスクリーニングを 3 回程度繰り返し、全てのプラークが HA 蛋白質を発現するクローンを得た (Fig. 3-2)。PCR により、HVT FC-126 親株 (非組換え体) が存在しないことを確かめた。構築した 4 種の HVT/AI の名称、用いた組換えプラスミド、プロモーターの種類等を Table 3-2 に示す。

サザンブロット法により、構築した 4 種の HVT/AI のゲノム構造を解析した。代表的な結果として、HVT/AI-Hu で得られた結果を以下に示す。まず、HA プローブを用いた試験では、HVT/AI-Hu と組換えプラスミドで 2.3 kb のバンドが検出されたのに対し、HVT 親株ではバンドは検出されなかった (Fig. 3-3)。一方、HVT 挿入部位プローブを用いた場合は、HVT/AI-Hu と組換えプラスミドで 2.3 kb 及び 1.3 kb のバンドが検出され、HVT 親株においては 0.9 kb のバンドが検出された (Fig. 3-4)。これらの結果により、HVT/AI-Hu が、意図した挿入部位に AIV HA 遺伝子を保持することが明らかとなった。HVT/AI-cmv、HVT/AI-bac、及び HVT/AI-pec についても、同様の結果が得られた。

3-2 HVT/AI による抗原蛋白質発現の解析

HVT/AI による防御抗原蛋白質発現を、ウェスタンブロット法、及び IFA により解析した。ウェスタンブロット法では、HVT/AI のレーンで、分子量約 75kDa の位置に、HA 蛋白質に由来すると考えられるバンドが検出された。代表的な結果として、HVT/AI-Hu で得られた結果を Fig. 3-5 に示す。一方、HVT 親株や非感染 CEF のレーンでは、同様のバンドは検出されなかった。

IFA においても、HVT/AI 感染細胞において、特異的な緑色の蛍光を発するウイルスプラークを観察することができた (データ省略)。一方、HVT 親株ではこのような蛍光は観察されなかった。これらの結果により、HVT/AI が AIV (H5 亜型) HA 蛋白質を発現していることが明らかとなった。

3-3 HVT/AI の安定性、及び鶏における安全性

第1章と同様に、HVT/AI の安定性、及び鶏における安全性を調べた。まず、細胞内にて20代、または初日齢のSPF鶏体内にて5代継代したHVT/AIを、サザンブロット法、ウェスタンブロット法にて解析したところ、継代前と同一の結果が得られた（データ省略）。また、鶏内での継代による病原性上昇も見られなかったことから、HVT/AI が遺伝的、表現型的に安定であることが示された。

次に、HVT/AI-Hu の鶏での安全性は、18日齢のSPF鶏胚の卵内、または初日齢のSPF鶏の頸部皮下に、通常の10倍量である30,000 pfu のHVT/AI-Hu を接種して評価した（Table 3-3）。MDV 強毒株であるRB1B 投与群は50羽中48羽の鶏がマレック病を発症したことから、この試験で用いたSPF鶏がマレック病に感受性であることが確かめられた。HVT/AI-Hu 接種鶏では、120日齢までの観察期間中、マレック病やトリインフルエンザに伴う臨床症状、及び解剖時の肉眼病変も観察されず、また、120日齢でのHVT/AI-Hu 接種鶏の平均体重は、対照群の平均体重と統計的に差異が認められなかった。従って、HVT/AI-Hu が、対象動物である鶏において安全であることが明らかとなった。

3-4 トリインフルエンザに対する HVT/AI の免疫付与効果

まず、実験1にて、HA 遺伝子の発現制御に適したプロモーターを検討した。A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株のHA 遺伝子を保持し、その発現に異なるプロモーターを用いた3種のHVT/AI であるHVT/AI-cmv、HVT/AI-bac 及びHVT/AI-pec を、初日齢SPF鶏に接種した。その後、3-7週齢にかけて、血清抗体価を調べた。AIV HI 試験では、HVT/AI-cmv、HVT/AI-bac 及びHVT/AI-pec 接種群で、3週齢から7週齢にかけてHI 価の上昇が認められた（Fig. 3-6）。5週齢と6週齢においては、HVT/AI-cmv 接種群が他のワクチン接種群と比較して有意に高い平均HI 価を示した。一方、非接種対照群ではHI 価の上昇は認められず、不活化ワクチン陽性対照群では、HI 価の上昇が認められた（6週齢で $2^{6.9}$ 、7週齢で $2^{7.5}$ ）。

AIV ELISA 抗体価については、2種の市販 AIV ELISA キットにて評価をしたが、HVT/AI-cmv、HVT/AI-bac 及び HVT/AI-pec 接種群のいずれにおいても ELISA 価の上昇は見られなかった (Fig. 3-7)。これは、これらの ELISA キットが、様々な AIV 亜型に対する抗体を検出するのを目的として、亜型間でより良く保存された、nucleocapsid 蛋白質や matrix 蛋白質などの内部蛋白質に対する抗体を検出するように設計されているためであると考えられる。不活化ワクチン陽性対照群では、こうした内部蛋白質に対する抗体も誘導するため、ELISA 価の上昇が確認された。

次に、実験 2 において、HVT/AI-Hu の、3 種の高病原性 AIV H5 亜型株 (A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1) 株、A/chicken/West Java Sbg/29/2007 (H5N1) 株、A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) 株) に対する防御効果を評価した。この試験で A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株由来の HA 遺伝子を持つ HVT/AI-Hu を用いた理由は、現在世界各地で流行し大きな問題となっている H5N1 亜型株の HA 遺伝子に対し、A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株由来 HA 遺伝子の方が A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株の HA 遺伝子よりも類似性が高いためである。最近の H5N1 流行株の HA 遺伝子との相同性は、A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株由来 HA 遺伝子はほとんどが 90%以上であるのに対し、A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株の HA 遺伝子は 90%以下である。通常、HA 遺伝子の相同性が近い方が、攻撃に対する防御能が得られる可能性も高いとされている。尚、A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株の HA 遺伝子と、今回用いた攻撃株、A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1) 株、A/chicken/West Java Sbg/29/2007 (H5N1) 株、A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) 株の HA 遺伝子との相同性は、それぞれ 100%、93%、82%である。

高病原性 AIV H5 亜型株による攻撃に対し、攻撃対照群では、すべての鶏がトリインフルエンザを発症し、数日以内に死亡した。それに対し、HVT/AI-Hu 接種鶏では、A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1) 株に対して 100%、A/chicken/West Java Sbg/29/2007 (H5N1) 株に対して 80%、

A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) 株に対して 95%と、高い防御率を示した (Table 3-4)。

第 4 節 まとめ

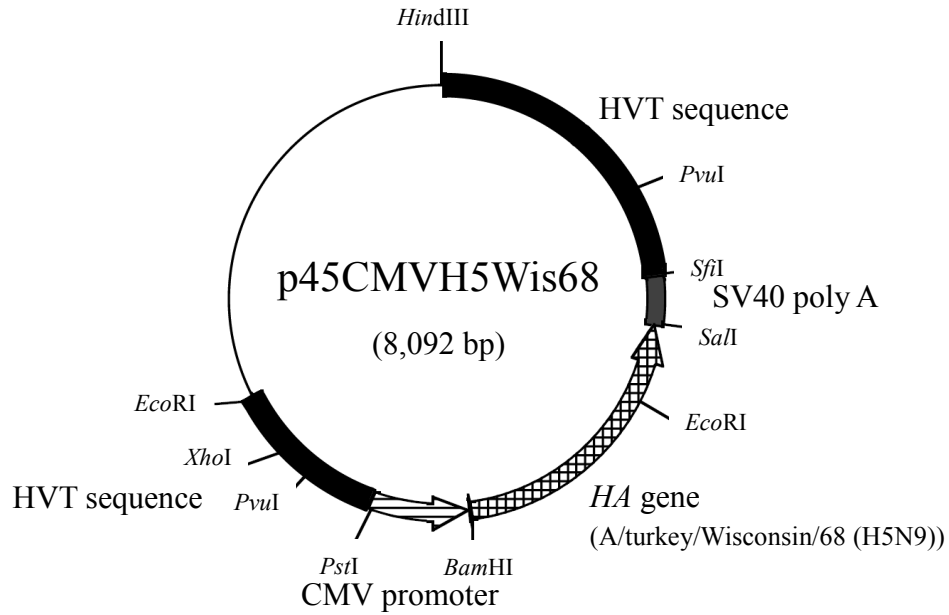
本章では、プロモーター、挿入遺伝子の由来が異なる 4 種類の HVT/AI を構築した。これらの HVT/AI はいずれも HA 蛋白質を発現しており、遺伝的、表現型的に安定であった。次に、挿入遺伝子の由来が同一で、プロモーターのみ異なる 3 種の HVT/AI、HVT/AI-cmv、HVT/AI-bac 及び HVT/AI-pec のトリインフルエンザに対する免疫誘導能を AIV HI 抗体価にて比較した。その結果、HVT/AI における HA 遺伝子発現には、CMV プロモーターが適していることが明らかとなった。次に、A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) 株 (clade 2.2) 由来の HA 遺伝子を CMV プロモーター制御下に発現する HVT/AI は、同じ H5 亜型に属する様々な高病原性 AIV (H5N1 亜型 clade 2.2、H5N1 亜型 clade 2.1.3、及び H5N2 亜型) に対する防御効果を付与できることが分かった。特に、HA 遺伝子相同性が 82%と非常に低い A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) 株の攻撃に対しても防御したことは、この HVT/AI の幅広い防御能を示している。従って、本研究により得られた知見は、この HVT/AI がトリインフルエンザの制御に有効に利用できることを示している。

また、これらの HVT/AI を接種した鶏では、HI 価の上昇は認められるものの、市販 AIV ELISA キットで調べたところ、ELISA 抗体価は上昇しなかった。一方、野外ウイルスに感染した鶏の血清では、HI 価、ELISA 抗体価とも上昇することが知られている。すなわち、このことは、HVT/AI が誘導する免疫が、野外ウイルスが引き起こす免疫応答と簡便な方法によって区別できることを示している。従って、HVT/AI はトリインフルエンザの制御に重要である DIVA に応用できると考えられる。

Table 3-1. Sequences of primers.

Primer name	Sequences
<i>Bam</i> HA-F	5'-TGACGGATCCATGGAAAGAATAGTGATTG-3'
<i>Sal</i> HA-R	5'-CTGACAGTCGACCTAGATGCAAATTCTGC-3'
<i>Bam</i> HA-F/Hu	5'-TGACGGATCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTG-3'
H5avirCS-R	5'-TAGTCCTCTTGTCTCTCTTTGAGGGCTATTTCTGAG-3'
H5avirCS-F	5'-CTCAAAGAGAGACAAGAGGACTATTTGGAGCTAT-3'
<i>Sal</i> HA-R/Hu	5'-CTGACAGTCGACTTAAATGCAAATTCTGC-3'
PrBac1	5'-CAGTGTCGCTGCAGCTCAGTGCATGCACGCTCATTGCCC-3'
PrBac2'	5'-GCTCTAGAGGCGTGGAGCTTGGGGGCTGCGGAGGAACAGAGAAGGGAAG-3'
HA1-P-F	5'-GGGGGTGGCAAGGAATG-3'
HA1-P-R	5'-GCTAGGGAACCTCGCCACTGT-3'

(A)



(B)

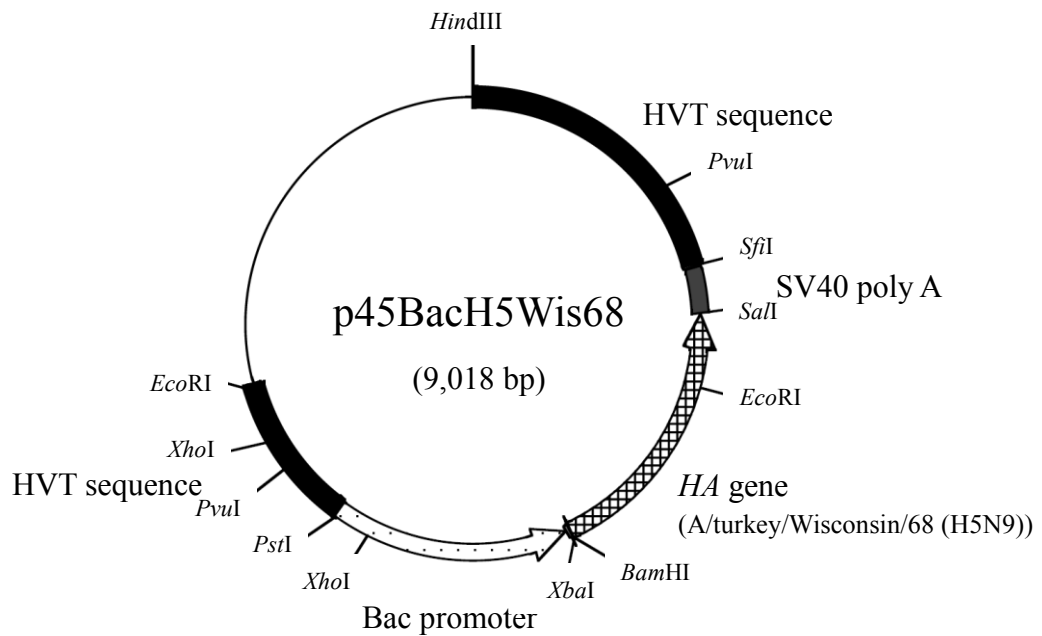
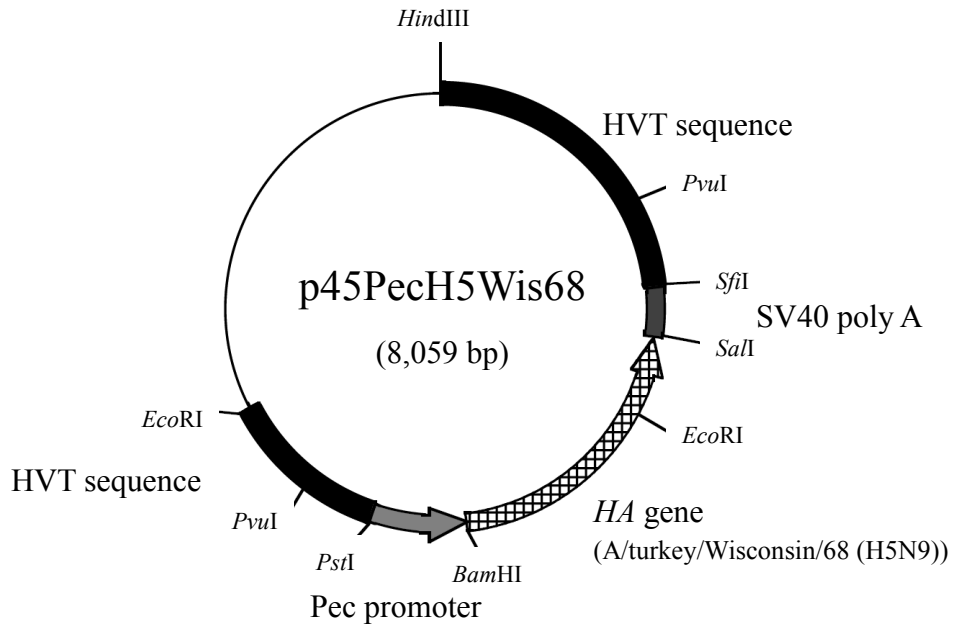


Fig. 3-1. Transfer plasmids for construction of HVT/AI, p45CMVH5Wis68 (A), p45BacH5Wis68 (B), p45PecH5Wis68 (C) and p45CMVH5HUNMod4999 (D).

(C)



(D)

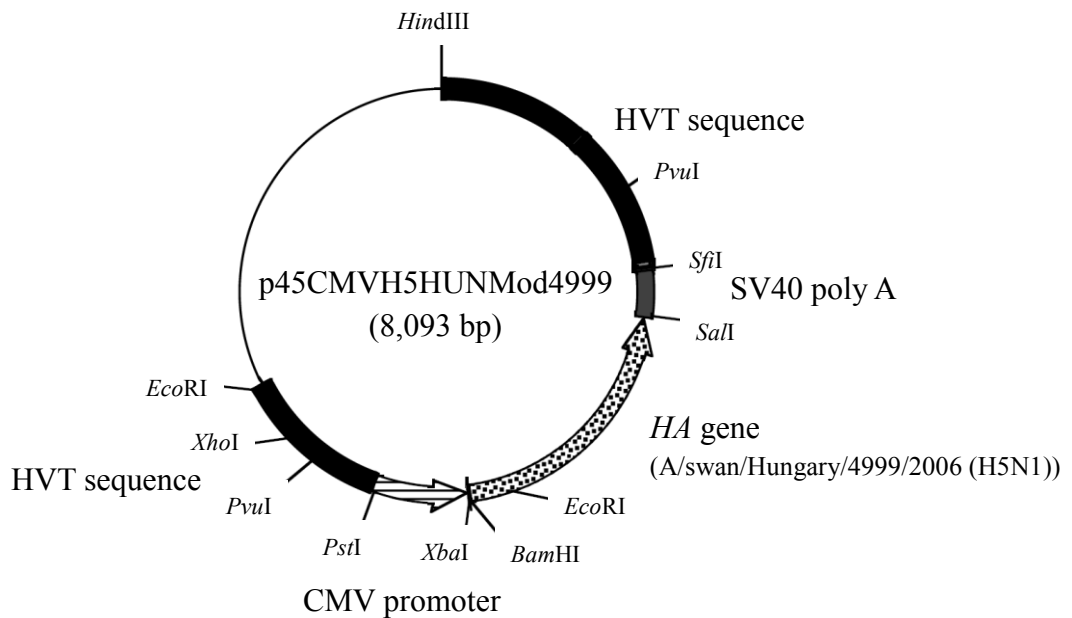


Fig. 3-1 (continued). Transfer plasmids for construction of HVT/AI, p45CMVH5Wis68 (A), p45BachH5Wis68 (B), p45PecH5Wis68 (C) and p45CMVH5HUNMod4999 (D).

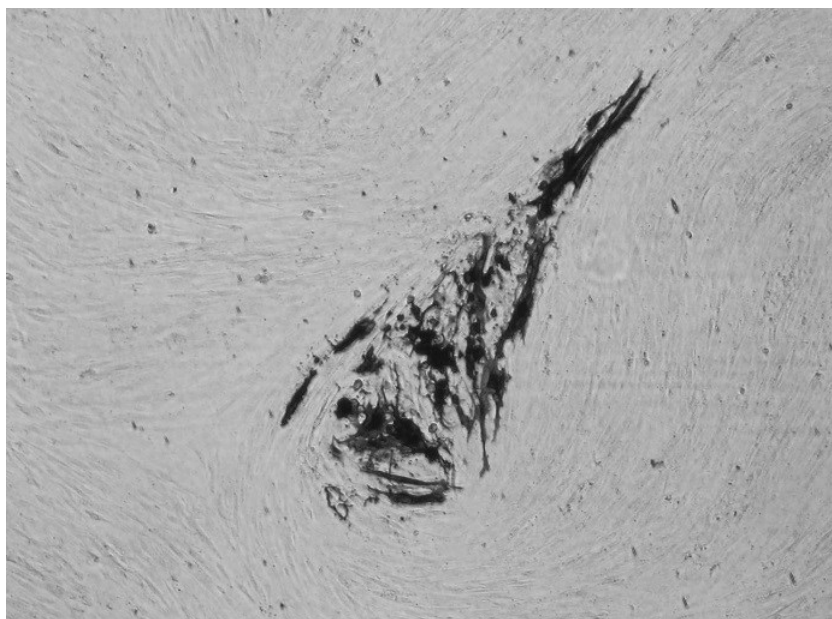


Fig. 3-2. Black plaque assay detecting expression of the HA protein of AIV H5 subtype by HVT/AI-cmv. CEF monolayer infected with HVT/AI-cmv was fixed with methanol:acetone. The monolayer with HVT/AI-cmv plaques was reacted with chicken anti-AIV HA serum, then with biotinylated anti-chicken IgG antibody and finally with streptavidin-alkaline phosphatase conjugates. Plaques expressing HA protein were stained by addition of BCIP/NBT solution.

Table 3-2. Constructed HVT/AI.

rHVT name	AIV strain	Transfer vector	Promoter
HVT/AI-cmv	AIV H5subtype, Wis68 strain ^A	p45CMVH5Wis68	CMV
HVT/AI-bac	AIV H5subtype, Wis68 strain ^A	p45BacH5Wis68	Bac
HVT/AI-pec	AIV H5subtype, Wis68 strain ^A	p45PecH5Wis68	Pec
HVT/AI-Hu	AIV H5 subtype, Hu06 strain ^B	p45CMVH5HUNMod4999	CMV

^A A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) strain

^B A/swan/Hungary/4999/2006 (H5N1) strain

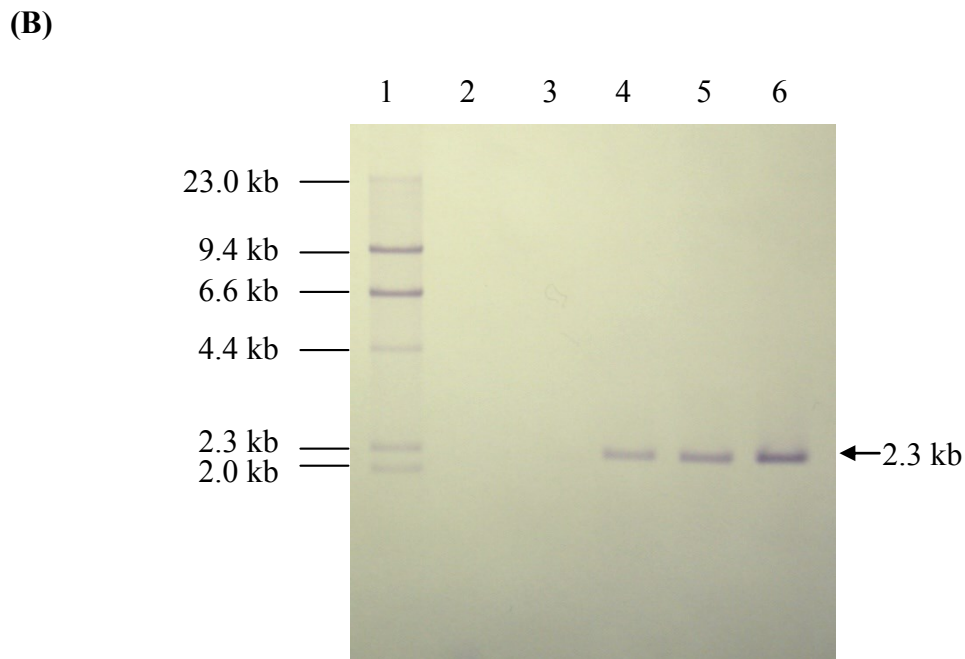
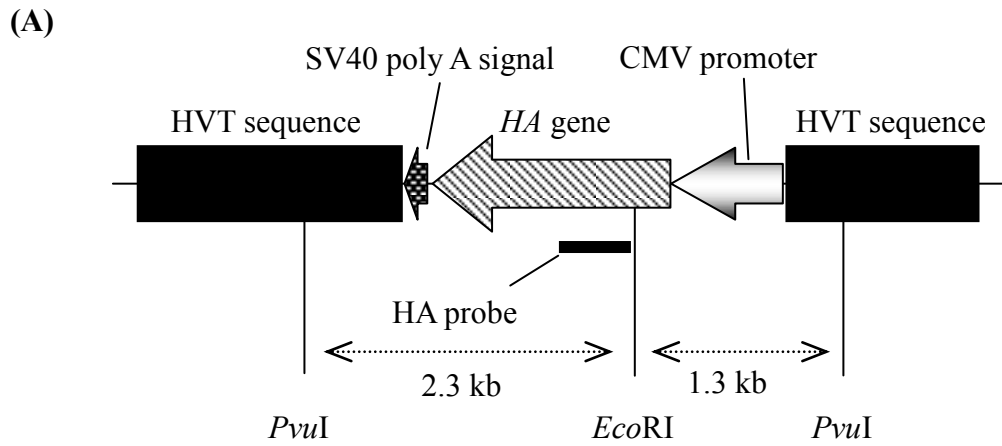


Fig. 3-3. Gene structure of HVT/AI-Hu and expected annealing site of the HA probe (A) and result of Southern blot using the HA probe (B). Lane 1 = DNA Molecular Weight Marker II: DIG-labeled (Roche), Lane 2 = uninoculated CEF control, Lane 3 = HVT parent, Lane 4 = HVT/AI-Hu, Lane 5 = the fifth *in vitro* passage of HVT/AI-Hu, Lane 6 = transfer plasmid: p45CMVH5HUNMod4999.

(A)

rHVT/AI-H5

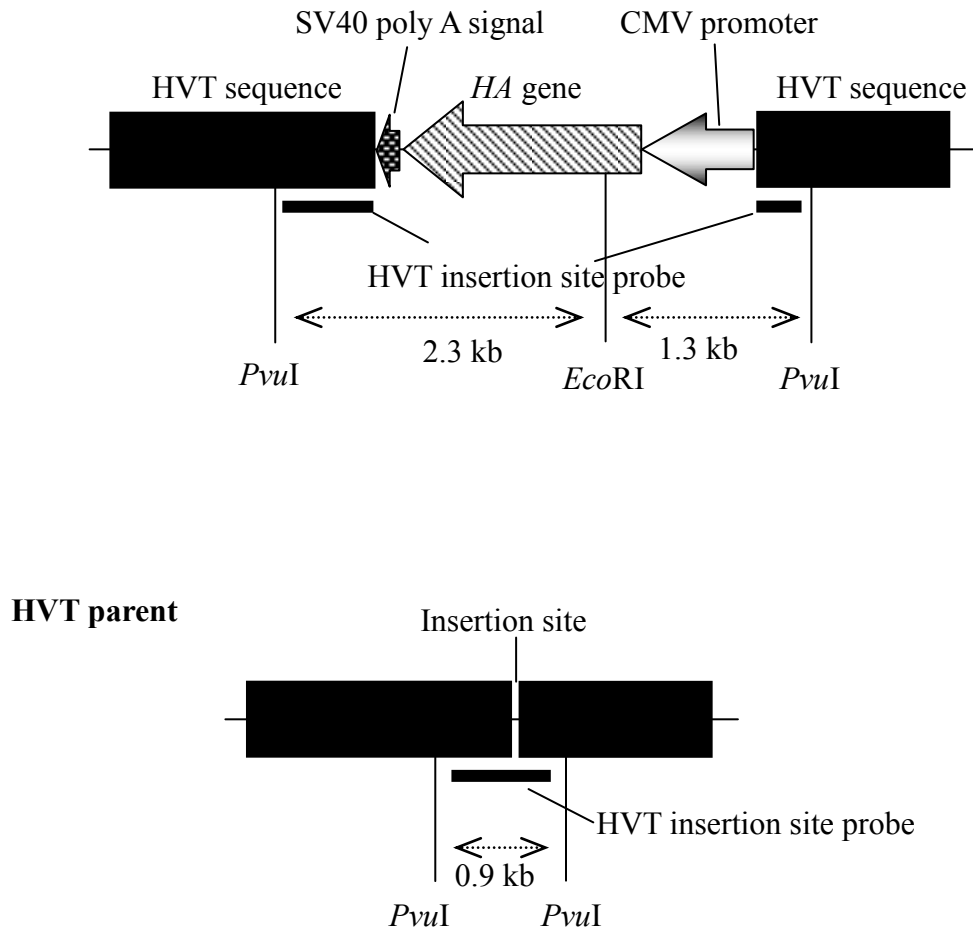


Fig. 3-4 (A). Gene structure of HVT/AI-Hu and HVT parent and expected annealing site of the HVT insertion site probe.

(B)

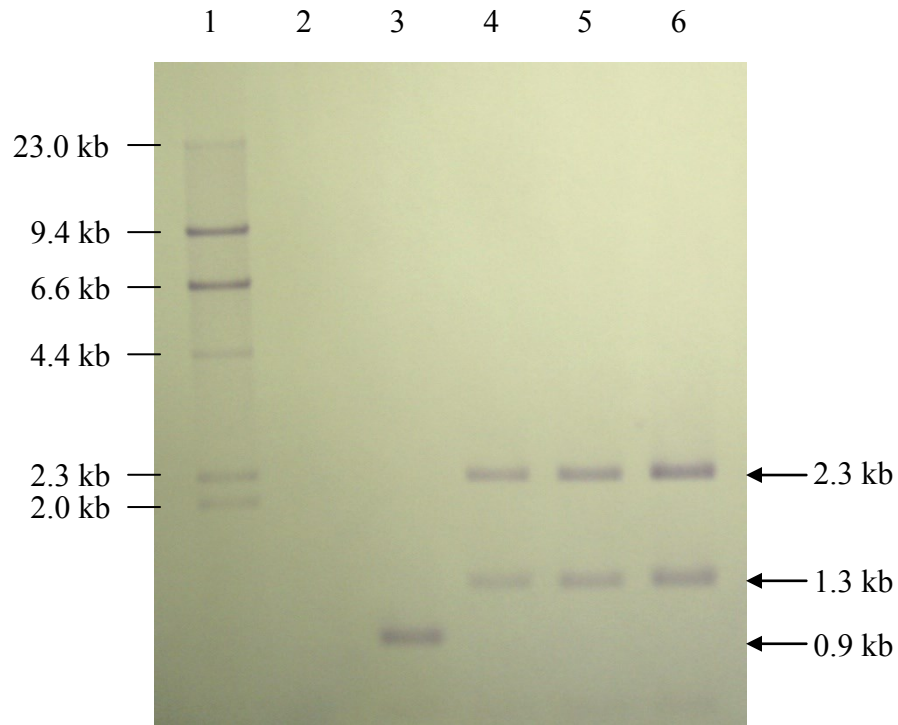


Fig. 3-4 (B). Result of Southern blot using the HVT insertion site probe. Lane 1 = DNA Molecular Weight Marker II: DIG-labeled (Roche), Lane 2 = uninoculated CEF control, Lane 3 = HVT parent, Lane 4 = HVT/AI-Hu, Lane 5 = the fifth *in vitro* passage of HVT/AI-Hu, Lane 6 = transfer plasmid: p45CMVH5HUNMod4999.

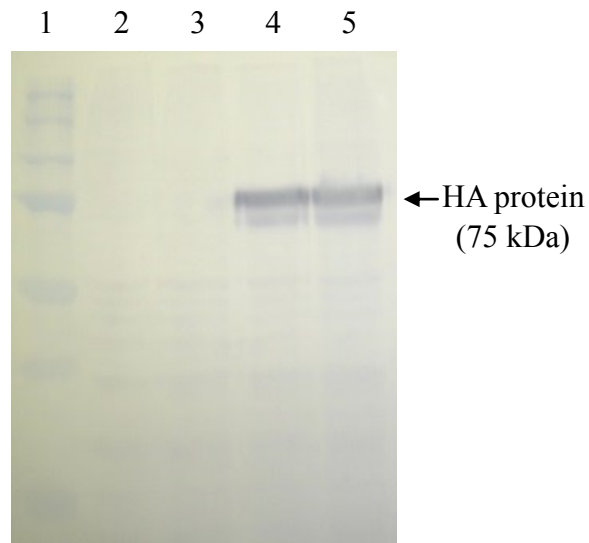


Fig. 3-5. Identification of the AIV HA protein expressed by HVT/AI-Hu in western blot analysis using chicken anti-AIV (H5 subtype) HA sera. CEF infected with viruses were lysed and separated on 8% acrylamide gel. Separated proteins were blotted on PVDF membrane and reacted with the goat anti-AIV (H5 subtype) HA serum, AP-labeled anti-chicken IgG antibody, and then developed with BCIP/NBT. Lane 1 = Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories), Lane 2 = uninoculated CEF control, Lane 3 = HVT parent, Lane 4 = HVT/AI-Hu, Lane 5 = the fifth *in vitro* passage of HVT/AI-Hu.

Table 3-3. Safety of HVT/AI-Hu in the overdose study.

Group	Vaccine route	hatched/# embryos set (% hatchability)	# chicks set	Mortality ^A	# chickens with adverse reactions or clinical signs	# chickens with MD lesions	Average weight (kg)
HVT/AI-Hu	<i>In ovo</i>	60/72 (83%)	50	7 ^B (0)	0	0	1.57
HVT/AI-Hu	SQ	166/185 ^C (90%)	50	1 ^C (0)	0	0	1.53
RB1B controls	Not applicable	166/185 (90%)	50	34 (33)	Not applicable	48	Not applicable
Negative controls	Sham <i>in ovo</i>	60/74 (81%)	50	9 ^C (0)	0	0	1.60

^A Total mortality (# with gross MD lesions)

^B Seven chickens in the *in ovo* group, one chicken in the SQ group, and nine chickens in the negative control group died before the end of the observation period, but causes of deaths were determined to be unrelated to the vaccine.

^C Hatchability for all non-inoculated embryos was calculated together and chicks were divided into groups after hatch.

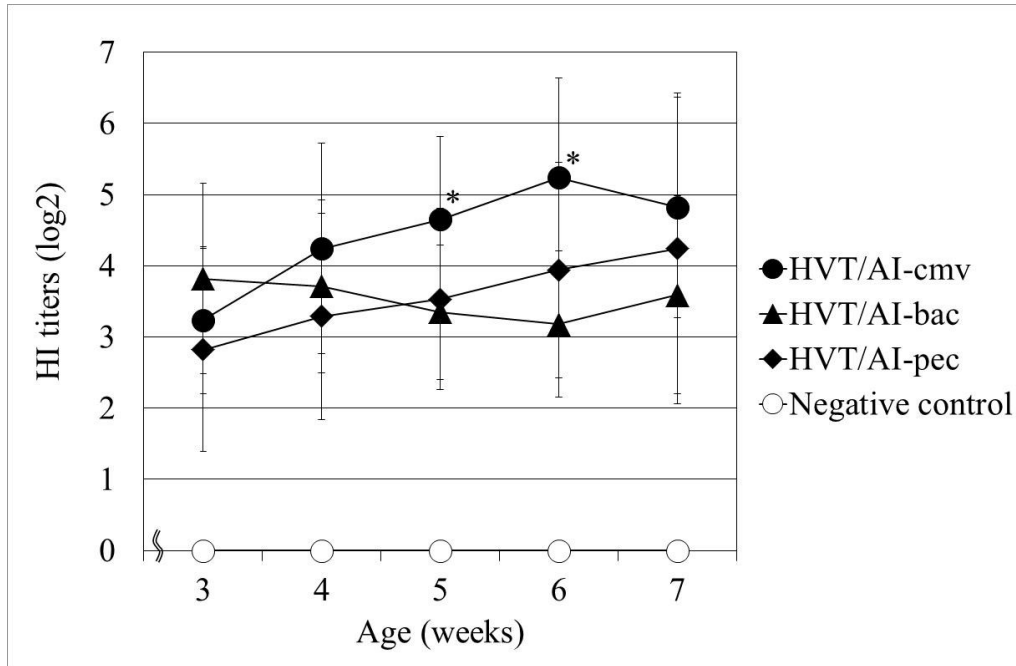
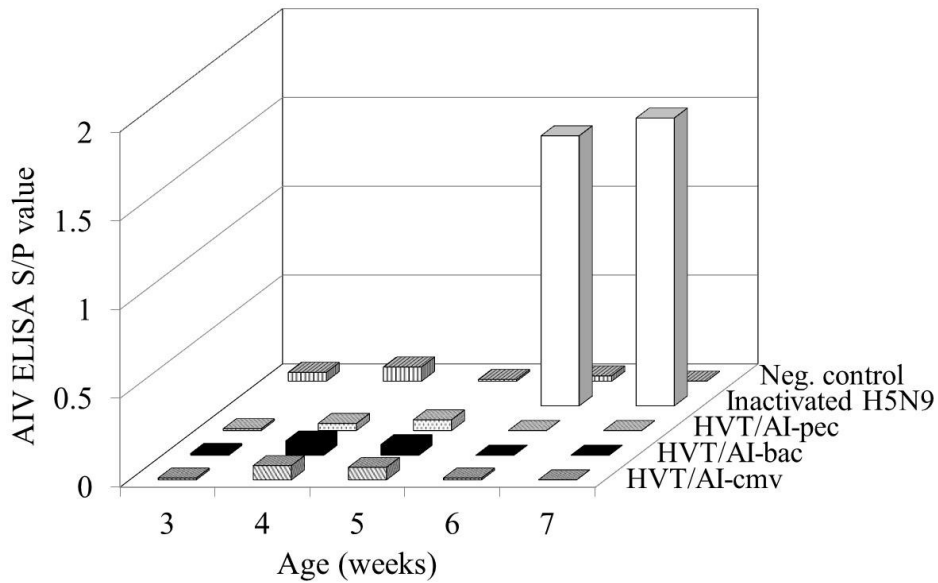


Fig. 3-6. AIV HI titers in chickens vaccinated with HVT/AI vaccines. SPF chickens inoculated with either HVT/AI-cmv, HVT/AI-bac or HVT/AI-pec at one day old were bled weekly between 3 and 7 weeks of age. Sera were evaluated by the AIV HI tests. Statistical differences in mean HI titers between HVT-AI vaccine groups were analyzed using one-way analysis of variance test followed by Tukey's HSD test. * $P < 0.05$

(A)



(B)

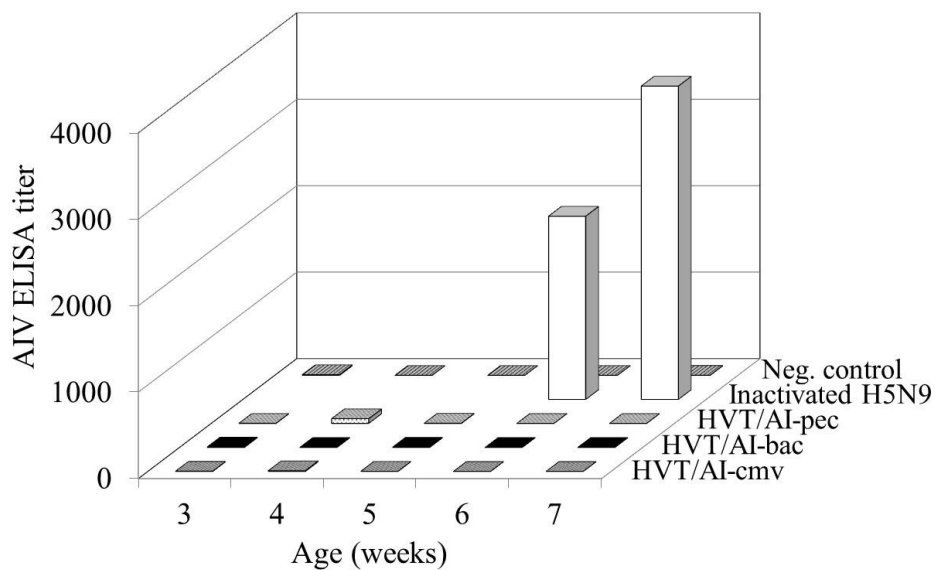


Fig. 3-7. ELISA titers in chickens vaccinated with HVT-AI vaccines. SPF chickens inoculated with either HVT/AI-cmv, HVT/AI-bac, HVT/AI-pec or inactivated AIV H5N9 vaccine at one day old were bled weekly between 3 and 7 weeks of age. Sera were evaluated by AIV ELISA tests using (A) FlockChek™ AIV Ab kit (Idexx Laboratories) and (B) ProFLOK® AIV Ab test kit (Zoetis). For FlockChek™ AIV Ab kit, S/P ratios of equal to or greater than 0.5 are considered positive. For ProFLOK® AIV Ab test kit, ELISA titers of equal to or greater than 570 are considered positive.

Table 3-4. Protection of HVT/AI-Hu against challenge with various highly pathogenic avian influenza H5 subtype.

Challenge strain	% Protection (# chickens protected/ # chickens challenged)
A/whooper swan/Mongolia/3/2005 (H5N1)	100% (30/30)
A/chicken/West Java Sbg/29/2007 (H5N1)	80% (16/20)
A/chicken/Queretaro/14588-19/95 (H5N2)	95% (19/20)

All chickens in the non-immunized, challenged positive control group died due to highly pathogenic avian influenza.

第4章 総括

本研究では、HVTに3種類の病原体の防御抗原遺伝子を挿入したrHVTを構築し、その解析を行うことにより、HVTの鶏用ベクターとしての有用性を検討した。

第1章では、伝染性喉頭気管炎ウイルスの防御抗原遺伝子であるgB遺伝子を挿入したHVT/LTを構築した。このHVT/LTは、ILTV gB蛋白質を発現し、また、細胞内での増殖性はHVT親株と比べて変化しなかった。従って、本研究で用いたUL45遺伝子とUL46遺伝子間の遺伝子挿入部位は、細胞内増殖能に影響を与えないことが明らかとなった。また、HVT/LTは遺伝的、表現型的に安定であり、鶏に接種した際に何ら副反応を起こさず、鶏内で継代した際にも病原復帰しないこと、さらに鶏間での伝播は限定的であることが分かった。最後に、HVT/LTは、鶏に接種した際に、伝染性喉頭気管炎に対する有効な防御免疫を誘導できることを見出した。現行の伝染性喉頭気管炎ワクチンは、病原性復帰するなど安全性に問題があることから、本研究が明らかにしたHVT/LTの特徴は次世代伝染性喉頭気管炎ワクチンとして非常に好ましいものであると言える。

第2章では、ニューカッスル病ウイルスの防御抗原遺伝子であるF遺伝子を挿入したHVT/NDを構築した。このHVT/NDはNDV F蛋白質を発現しており、鶏に接種した際にニューカッスル病に対する液性免疫、及び防御免疫を誘導できることを明らかにした。また、ニューカッスル病に対する防御免疫は、接種3週以降に顕著に認められること、さらに、その後少なくとも19週齢まで維持されることが分かった。液性免疫については、少なくとも50週齢まで維持された。HVTは、潜伏感染して体内にとどまることが知られており、HVT/NDの免疫が長期に渡って維持されるのも、潜伏感染により長い期間に渡ってF抗原に対する免疫刺激が続くためであると考えられる。現行のニューカッスル病ワクチンに、一回の接種でこのように長い免疫持続期間を示すものではなく、この知見は

HVT/ND の有用性を示すものである。さらに、HVT/ND は、NDV に対する移行抗体を保有している鶏においても、防御効果を示した。これは、HVT が細胞随伴性ウイルスであり、感染の進行が直接接触した細胞間で行われることから、血中に存在する NDV 抗体の影響を受けないためと考えられる。

また、HVT/ND は、HVT/LT と同様、遺伝的、表現型的に安定であり、過剰量投与した際も全く副反応を示さなかった。現行のニューカッスル病生ワクチンは残留病原性に問題を抱えていることから、HVT/ND の安全性も大きなメリットであると言える。このように、本研究で得られた HVT/ND に関する知見は、HVT/ND が現行ワクチンと比較して多くの優れた特長を備えていることを示しており、HVT/ND の次世代ワクチンとしての応用が期待される。

第 3 章では、トリインフルエンザウイルスの防御抗原遺伝子である *HA* 遺伝子を挿入した HVT/AI を構築した。H5 亜型株由来の同一遺伝子を持ち、プロモーターのみ異なる 3 種の HVT/AI を用い、そのトリインフルエンザに対する液性免疫誘導能を比較することにより、CMV プロモーターが *HA* 遺伝子発現制御に適していることを見出した。また、次に H5 亜型株由来の *HA* 遺伝子を CMV プロモーター制御下に発現する HVT/AI は、同じ H5 亜型に属する様々な高病原性 AIV に対する幅広い防御効果を付与できることが分かった。さらに、HVT/AI が誘導する液性免疫は HI 試験によって容易に検出できる一方で、市販 AIV ELISA では検出されないことが明らかになった。これはトリインフルエンザの制御に用いるワクチンに要求される、DIVA、すなわちワクチン接種鶏と野外ウイルス感染鶏の区別に応用できることを示している。

これらの知見をまとめると、本研究で構築した組換え HVT ベクターワクチンは、いずれも現行ワクチンと比較して優れた安全性を持つこと、免疫がより長期に渡って維持されることが示された。また、これらの組換え HVT ベクターワクチンは移行抗体の影響を受けにくく、幅広い防御効果を付与できることも明らかとなった。従って、HVT は、鶏用の次世代ワクチンベクターとして非常に有用であると言える。

参考文献

1. Abdelwhab E.M., Grund C., Aly M.M., Beer M., Harder T.C. and Hafez H.M., Multiple dose vaccination with heterologous H5N2 vaccine: immune response and protection against variant clade 2.2.1 highly pathogenic avian influenza H5N1 in broiler breeder chickens. *Vaccine*, **29**, 6219-6225 (2011).
2. Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Rock D.L. and Kutish G.F., The genome of turkey herpesvirus. *J Virol.*, **75**, 971-978 (2001).
3. Andreasen J.R., Jr., Glisson J.R., Goodwin M.A., Resurreccion R.S., Villegas P. and Brown J., Studies of infectious laryngotracheitis vaccines: immunity in layers. *Avian Dis.*, **33**, 524-530 (1989).
4. Ballagi-Pordany A., Wehmann E., Herczeg J., Belák S. and Lomniczi B., Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the *F* gene. *Arch Virol.*, **141**, 243-261 (1996).
5. Ballay A., Levrero M., Buendia M.A., Tiollais P. and Perricaudet M., *In vitro* and *in vivo* synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J.*, **4**, 3861-3865 (1985).
6. Boursnell M.E., Green P.F., Campbell J.I., Deuter A., Peters R.W., Tomley F.M., Samson A.C., Chambers P., Emmerson P.T. and Binns M.M., Insertion of the fusion gene from Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant. *J Gen Virol.*, **71**, 621-628 (1990).
7. Bublot M., Laplace E. and Audonnet J.C., Non-essential loci in the BamHI-I and -F fragments of the HVT FC126 genome. *Acta Virol.*, **43**, 181-185 (1999).
8. Calnek B.W., Shek W.R. and Schat K.A., Latent infections with Marek's disease virus and turkey herpesvirus. *J Natl Cancer Inst.*, **66**, 585-590 (1981).
9. Capua I. and Alexander D.J., Avian influenza vaccines and vaccination in birds. *Vaccine*, **26**, D70-73 (2008).

10. Chen H.Y., Cui P., Cui B.A., Li H.P., Jiao X.Q., Zheng L.L., Cheng G. and Chao A.J., Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus and chicken IL-18. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **63**, 289-295 (2011).
11. Cho B.R. and Kenzy S.G., Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 3. Transmission in three different lines of chickens. *Poultry Science*, **54**, 109-115 (1975).
12. Cranage M.P., Kouzarides T., Bankier A.T., Satchwell S., Weston K., Tomlinson P., Barrell B., Hart H., Bell S.E. and Minson A.C., Identification of the human cytomegalovirus *glycoprotein B* gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J.*, **5**, 3057-3063 (1986).
13. Crespo R., Woolcock P.R., Chin R.P., Shivaprasad H.L. and Garcia M., Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. *Avian Dis.*, **51**, 858-862 (2007).
14. Cronenberg A.M., van Geffen C.E., Dorrestein J., Vermeulen A.N. and Sondermeijer P.J., Vaccination of broilers with HVT expressing an Eimeria acervulina antigen improves performance after challenge with Eimeria. *Acta Virol.*, **43**, 192-197 (1999).
15. Darteil R., Bublot M., Laplace E., Bouquet J.F., Audonnet J.C. and Rivière M., Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, **211**, 481-490 (1995).
16. Davison S., Gingerich E.N., Casavant S. and Eckroade R.J., Evaluation of the efficacy of a live fowlpox-vectored infectious laryngotracheitis/avian encephalomyelitis vaccine against ILT viral challenge. *Avian Dis.*, **50**, 50-54 (2006).
17. Dortmans J.C., Peeters B.P. and Koch G., Newcastle disease virus outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? *Vet Microbiol.*, **160**, 17-22 (2012).
18. Dufour-Zavala L., Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian Dis.*, **52**, 1-7 (2008).

19. FAO, Approaches to controlling, preventing and eliminating H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in endemic countries. Rome; (2011).
20. Garcia M., Spatz S. and Guy J.S., Infectious Laryngotracheitis. In: *Diseases of poultry*, 13th ed. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. and Nair V., eds. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. pp. 161-180 (2013).
21. Graham F.L., Adenoviruses as expression vectors and recombinant vaccines. *Trends Biotechnol.*, **8**, 85-87 (1990).
22. Griffin A.M., The nucleotide sequence of the glycoprotein *gB* gene of infectious laryngotracheitis virus: analysis and evolutionary relationship to the homologous gene from other herpesviruses. *J Gen Virol.*, **72**, 393-398 (1991).
23. Group WOFHNEW., Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*, **14**, e1 (2008).
24. Guy J.S., Barnes H.J., Munger L.L. and Rose L., Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Dis.*, **33**, 316-323 (1989).
25. Guy J.S., Barnes H.J. and Morgan L.M., Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Dis.*, **34**, 106-113 (1990).
26. Guy J.S., Barnes H.J. and Smith L., Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis.*, **35**, 348-355 (1991).
27. Handberg K.J., Nielsen O.L. and Jorgensen P.H., The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.*, **30**, 243-249 (2001).
28. Hilbink F.W., Oei H.L. and van Roozelaar D.J., Virulence of five live vaccines against avian infectious laryngotracheitis and their immunogenicity and spread after eyedrop or spray application. *Vet Q.*, **9**, 215-225 (1987).
29. Hu S., Ma H., Wu Y., Liu W., Wang X., Liu Y. and Liu X., A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*, **27**, 904-910 (2009).

30. Hunt L.A., Brown D.W., Robinson H.L., Naeve C.W. and Webster R.G., Retrovirus-expressed hemagglutinin protects against lethal influenza virus infections. *J Virol.*, **62**, 3014-3019 (1988).
31. Islam A. and Walkden-Brown S.W., Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J Gen Virol.*, **88**, 2121-2128 (2007).
32. Islam A.F.M.F., Walkden-Brown S.W., Groves P.J. and Underwood G.J., Kinetics of Marek's disease virus (MDV) infection in broiler chickens 1: effect of varying vaccination to challenge interval on vaccinal protection and load of MDV and herpesvirus of turkey in the spleen and feather dander over time. *Avian Pathol.*, **37**, 225-235 (2008).
33. Kawamura H., King, Jr. D.J. and Anderson D.P., A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian Dis.*, **13**, 853-863 (1969).
34. Kumar S., Nayak B., Collins P.L. and Samal S.K., Evaluation of the Newcastle disease virus F and HN proteins in protective immunity by using a recombinant avian paramyxovirus type 3 vector in chickens. *J Virol.*, **85**, 6521-6534 (2011).
35. Lee S.W., Markham P.F., Coppo M.J., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H., Browning G.F., Ficorilli N., Hartley C.A. and Devlin J.M., Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*, **337**, 188 (2012).
36. Lowe R.S., Keller P.M., Keech B.J., Davison A.J., Whang Y., Morgan A.J., Kieff E. and Ellis R.W., Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **84**, 3896-3900 (1987).
37. Marlin S.D., Highlander S.L., Holland T.C., Levine M. and Glorioso J.C., Antigenic variation (mar mutations) in herpes simplex virus glycoprotein B can induce temperature-dependent alterations in gB processing and virus production. *J Virol.*, **59**, 142-153 (1986).

38. Miller P.J., King D.J., Afonso C.L. and Suarez D.L., Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*, **25**, 7238-7246 (2007).
39. Miller P.J., Estevez C., Yu Q., Suarez D.L. and King D.J., Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis.*, **53**, 39-49 (2009).
40. Miller P.J. and Koch G., Newcastle Disease. In: *Diseases of poultry*, 13th ed. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. and Nair V., eds. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. pp. 89-107 (2013).
41. Morgan R.W., Cantello J.L. and McDermott C.H., Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Dis.*, **34**, 345-351 (1990).
42. Morgan R.W., Gelb J. Jr, Schreurs C.S., Lütticken D., Rosenberger J.K. and Sondermeijer P.J., Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.*, **36**, 858-870 (1992).
43. Morgan R.W., Gelb J. Jr, Pope C.R. and Sondermeijer P.J., Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies. *Avian Dis.*, **37**, 1032-1040 (1993).
44. Meulemans G., Gonze M., Carlier M.C., Petit P. and Burnyand Lê Long A., Protective effects of HN and F glycoprotein-specific monoclonal antibodies on experimental Newcastle disease. *Avian Pathol.*, **15**, 761-768 (1986).
45. Nagai Y., Yoshida T., Hamaguchi M., Naruse H., Iinuma M., Maeno K. and Matsumoto T., The pathogenicity of Newcastle Disease Virus isolated from migrating and domestic ducks and the susceptibility of the viral glycoproteins to proteolytic cleavage. *Microbiolol. Immunol.*, **24**, 173-177 (1980).
46. Nakaya T., Cros J., Park M.S., Nakaya Y., Zheng H., Sagraera A., Villar E., García-Sastre A. and Palese P., Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol.*, **75**, 11868-11873 (2001).

47. Ogawa R., Yanagida N., Saeki S., Saito S., Ohkawa S., Gotoh H., Kodama K., Kamogawa K., Sawaguchi K. and Iritani Y., Recombinant fowlpox viruses inducing protective immunity against Newcastle disease and fowlpox viruses. *Vaccine*, **8**, 486-490 (1990).
48. OIE, Avian Influenza. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014*, Chapter 2.3.4. OIE, Paris, France. (2014).
49. OIE, Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014*, Chapter 2.3.14. OIE, Paris, France. (2014).
50. Oldoni I. and Garcia M., Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of multiple genome regions. *Avian Pathol.*, **36**, 167-176 (2007).
51. Panicali D., Davis S.W., Weinberg R.L. and Paoletti E., Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: biological activity of recombinant vaccinia virus expressing influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **80**, 5364-5368 (1983).
52. Pereira L., Function of glycoprotein B homologues of the family Herpesviridae. *Infect Agents Dis.*, **3**, 9-28 (1994).
53. Poulsen D.J., Burton C.R.A., O'Brian J.J., Rabin S.J. and Keeler C.L. Jr., Identification of the infectious laryngotracheitis virus glycoprotein *gB* gene by the polymerase chain reaction. *Virus genes*, **514**, 335-347 (1991).
54. Reddy S.K., Sharma J.M., Ahmad J., Reddy D.N., McMillen J.K., Cook S.M., Wild M.A. and Schwartz R.D., Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an *in ovo* vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, **14**, 469-477 (1996).
55. Roberts A., Kretzschmar E., Perkins A.S., Forman J., Price R., Buonocore L., Kawaoka Y. and Rose J.K., Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J Virol.*, **72**, 4704-4711 (1998).

56. Rodriguez-Avila A., Oldoni I., Riblet S. and Garcia M., Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILT) vaccines. *Avian Dis.*, **51**, 905-911 (2007).
57. Ross L.J., Binns M.M., Tyers P., Pastorek J., Zelnik V. and Scott S., Construction and properties of a turkey herpesvirus recombinant expressing the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J Gen Virol.*, **74**, 371-377 (1993).
58. Sabbaj S., Pass R.F., Goepfert P.A. and Pichon S., Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *J Infect Dis.*, **203**, 1534-1541 (2011).
59. Sakaguchi M., Nakamura H., Sonoda K., Okamura H., Yokogawa K., Matsuo K. and Hira K., Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine*, **16**, 472-479 (1998).
60. Sato H., Oh-hira M., Ishida N., Imamura Y., Hattori S. and Kawakita M., Molecular cloning and nucleotide sequence of P, M and F genes of Newcastle disease virus avirulent strain D26. *Virus Res.*, **7**, 241-255 (1987).
61. Schat K.A., Calnek B.W. and Fabricant J., Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. *Avian Pathol.*, **11**, 593-605 (1982).
62. Schat K.A. and Nair V., Marek's disease. In: *Diseases of poultry*, 13th ed. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. and Nair V., eds. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. pp. 515-552 (2013).
63. Sellers H.S., Garcia M., Glisson J.R., Brown T.P., Sander J.S. and Guy J.S., Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian Dis.*, **48**, 430-436 (2004).
64. Senne D.A., King D.J. and Kapczynski D.R., Control of Newcastle disease by vaccination. *Dev Biol (Basel)*, **119**, 165-170 (2004).
65. Shih M., Arsenakis M., Tiollaist P. and Roizman B., Expression of hepatitis B virus S gene by herpes simplex virus type 1 vectors carrying alpha- and beta-regulated gene chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **81**, 5867-5870 (1984).

66. Sims L.D., Lessons learned from Asian H5N1 outbreak control. *Avian Dis.*, **51**, 174-181 (2007).
67. Smith G.L., Mackett M. and Moss B., Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature*, **302**, 490-495 (1983).
68. Sonoda K., Sakaguchi M., Okamura H., Yokogawa K., Tokunaga E., Tokiyoshi S., Kawaguchi Y. and Hirai K., Development of an effective polyvalent vaccine against both Marek's and Newcastle diseases based on recombinant Marek's disease virus type 1 in commercial chickens with maternal antibodies. *J Virol.*, **74**, 3217-3226 (2000).
69. Spear P.G., Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminors in Virol.*, **4**, 167-180 (1993).
70. Sun H.L., Wang Y.F., Tong G.Z., Zhang P.J., Miao D.Y., Zhi H.D., Wang M. and Wang M., Protection of chickens from Newcastle disease and infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus co-expressing the F, HN genes of Newcastle disease virus and gB gene of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.*, **52**, 111-117 (2008).
71. Swayne D.E., Vaccines for List A poultry diseases: emphasis on avian influenza. *Dev Biol (Basel)*, **114**, 201-212 (2003).
72. Swayne D.E., Suarez D.L., Schultz-Cherry S., Tumpey T.M., King D.J., Nakaya T., Palese P. and Garcia-Sastre A., Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against influenza and Newcastle disease. *Avian Dis.*, **47**, 1047-1050 (2003).
73. Swayne D.E. and Kapczynski D., Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunol. Rev.*, **225**, 314-331 (2008).
74. Swayne D.E., The role of vaccines and vaccination in high pathogenicity avian influenza control and eradication. *Expert rev vaccines*, **11**, 877-880 (2012).
75. Swayne D.E., Suarez D.L. and Sims L.D., Influenza. In: *Diseases of poultry*, 13th ed. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. and Nair V., eds. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. pp. 181-218 (2013).

76. Taylor J., Weinberg R., Kawaoka Y., Webster R.G. and Paoletti E., Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine*, **6**, 504-508 (1988).
77. Taylor J., Edbauer C., Rey-Senelonge A., Bouquet J.F., Norton E., Goebel S., Desmettre P. and Paoletti E., Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *J Virol.*, **64**, 1441-1450 (1990).
78. Tong G.Z., Zhang S.J., Wang L., Qiu H.J., Wang Y.F. and Wang M., Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.* **30**, 143-148 (2001).
79. Tozawa H., Komatsu H., Ohkata K., Nakajima T., Watanabe M., Tanaka Y. and Arifuku M., Neutralizing activity of the antibodies against two kinds of envelope glycoproteins of Sendai virus. *Arch Virol.*, **91**, 145-161 (1986).
80. Tsukamoto K., Saito S., Saeki S., Sato T., Tanimura N., Isobe T., Mase M., Imada T., Yuasa N. and Yamaguchi S., Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *J Virol.*, **76**, 5637-5645 (2002).
81. Walsh E.P., Baron M.D., Rennie L.F., Monaghan P., Anderson J. and Barrett T., Recombinant rinderpest vaccines expressing membrane-anchored proteins as genetic markers: evidence of exclusion of marker protein from the virus envelope. *J Virol.*, **74**, 10165-10175 (2000).
82. Wang Z., Hangartner L., Cornu T.I., Martin L.R., Zuniga A., Billeter M.A. and Naim H.Y., Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. *Vaccine*, **19**, 2329-2336 (2001).
83. Witter R.L., Nazerian K., Purchase H.G. and Burgoyne G.H., Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am J Vet Res.*, **31**, 525-538 (1970).
84. Witter R.L., Protection by attenuated and polyvalent vaccines against highly virulent strains of Marek's disease virus. *Avian Pathol.*, **11**, 49-62 (1982).

85. Witter R.L. and Lee L.F., Polyvalent Marek's disease vaccines: Safety, efficacy and protective synergism in chickens with maternal antibodies. *Avian Pathol.*, **13**, 75-92 (1984).
86. Yamane N., Odagiri T., Arikawa J., Morita M., Sukeno N. and Ishida N., Isolation of Orthomyxoviruses from Migrating and Domestic Ducks in Northern Japan in 1976-1977. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, **31**, 407-415 (1978).
87. Yanagida N., Ogawa R., Li Y., Lee L.F. and Nazerian K., Recombinant Fowl Pox virus expressing the glycoprotein B homolog and the *pp38* gene of Marek's disease virus. *J Virol.*, **66**, 1402-1408 (1992).
88. Yanagida N., Yoshida S., Nazerian K. and Lee L., Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins. *J Gen Virol.*, **74**, 1837-1845 (1993).
89. York J.J. and Fahey K.J., Humoral and cell mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Arch. Virol.*, **115**, 289-297 (1990).
90. Zarling J.M., Moran P.A., Burke R.L., Pachl C., Berman P.W. and Lasky L.A., Human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus-infected cells. IV. Recognition and activation by cloned glycoproteins gB and gD. *J Immunol.*, **136**, 4669-4673 (1986).
91. Zygraich N. and Huygelen C., Inoculation of one-day old chicks with different strains of turkey herpesvirus. II. Virus replication in tissues of inoculated animals. *Avian Dis.*, **16**, 793-798 (1972).

学術雑誌掲載論文目録

本学位論文は、学術雑誌に掲載された以下の論文を基礎とするものである。

1. Esaki M., Noland L., Eddins T., Godoy A., Saeki S., Saitoh S., Yasuda A. and Dorsey K.M., Safety and efficacy of a turkey herpesvirus vector laryngotracheitis vaccine for chickens. *Avian Dis.*, **57**, 192-198 (2013).
2. Esaki M., Godoy A., Rosenberger J.K., Rosenberger S.C., Gardin Y., Yasuda A. and Dorsey K.M., Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Dis.*, **57**, 750-755 (2013).
3. Esaki M., Noland L., Dorsey K.M. and Yasuda A., Serological evaluation of turkey herpesvirus vector vaccines expressing the hemagglutinin gene of avian influenza virus H5 subtype under three different promoters. *J Poult Sci.*, **52**, 68-73 (2015).

謝 辞

本論文作成に当たり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました日本大学薬学部製剤学研究室 伴野和夫教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、多大な御助言と御指導を賜りましたセバ・ジャパン株式会社 安田幹司代表取締役役に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行に際し、有益な御助言を賜りましたセバ・バイオミューン社 Vice President Kristi Moore Dorsey 博士に深く感謝の意を表します。

本論文作成に当たり、有益な御助言を賜りました、日本大学薬学部微生物学研究室 井口法男教授、日本大学薬学部臨床医学研究室 鈴木孝教授、日本大学薬学部臨床医学研究室 小野真一教授、日本大学薬学部製剤学研究室 鈴木豊史准教授に深謝致します。

本研究において数々の御助言、御助力を頂きました、セバ・ジャパン株式会社 齊藤修治成田研究所長、佐伯早木子主任研究員ならびにセバ・ジャパン株式会社の諸氏、及びセバ・バイオミューン社 Lauren Noland 氏、Tim Eddins 氏、Alecia Godoy 博士、Peter Flegg 氏ならびにセバ・バイオミューン社の諸氏に深く感謝致します。

また、本研究において有益な御助言を頂きました、セバ・サンテアニマル株式会社の Yannick Gardin 博士、Steve Chu 博士に心より感謝致します。